

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

I



TESIS DOCTORAL

**ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Dulín Íñiguez

Bajo la dirección de los doctores:

Pedro García Barreno, M^a Concepción Guisasola Zulueta

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-4101-8

© Elena Dulín Íñiguez, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR –I



**ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.**

Elena Dulín Iñiguez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR- I



**ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Dulín Iñiguez

Bajo la Dirección de los doctores
D. Pedro García Barreno
Dña. M^a Concepción Guisasola Zulueta

MADRID, 2009

DEDICATORIA

A Alfonso,
A Pablo y Diego
A José Luis y Elena

La presente tesis ha sido realizada en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental y en el laboratorio de Metabolopatías del Servicio de Bioquímica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón”, bajo la dirección de los doctores P García Barreno y MC Guisasola Zulueta y financiada por una ayuda FIS 03/1308.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pedro García Barreno, jefe de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por su permanente estímulo y por haber conseguido llegar hasta aquí

A la Dra. M^a Concepción Guisasola, coordinadora del laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, por haberme dado la oportunidad de colaborar en sus proyectos, por su apoyo y ánimo en los momentos más difíciles, por su colaboración y estímulo, pero sobre todo por su amistad

Al Dr. Esteban Mancheño, jefe del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y mi maestro, por haberme transmitido sus conocimientos, y por su apoyo confianza durante todos mis años de profesión junto a él.

A M^a Jesús Sánchez, Cristina García y Carmela Molina, técnicos especialistas de laboratorio por su ayuda técnica

A la Dra. M^a Dolores Vigil, adjunto del Servicio de Calidad, por su asesoramiento estadístico y por su amistad

A todos los compañeros del laboratorio de Metabolopatías por su comprensión

A toda mi familia, por las horas robadas

ABREVIATURAS

ADA: Adenosín deaminasa

ADMA: Dimetilarginina asimétrica

AdoHcy: S-adenosilhomocisteína

AdoMet: S-adenosilmetionina

AMM: Aciduria metil malónica

CblC: Cobalamina C

CblD: Cobalamina D

CblF: Cobalamina F

CBS: Cistationina β sintasa

CC: Genotipo salvaje (*Wild Type*) para la mutación 677C>T

CT: Genotipo heterocigoto para la mutación 677C>T

DDAH: Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa

EC: Nomenclatura enzimática

ECV: Enfermedad cardiovascular

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

FPIA: Polarización de fluorescencia

FRV: Factor de riesgo vascular

GRP78: *glucose-related-protein*

Hb: Hemoglobina

Hcy: Homocisteína

HDL: Lipoproteínas de alta densidad. *High density lipoproteins*

HHcy: Hiperhomocisteinemia

HM: Genotipo homocigoto mutado

hsp: Gen que codifica proteínas de choque térmico

Hsps: Proteínas de choque térmico. *Heat Shock Protein*

HSP: Familia de proteínas de choque térmico

HSR: Respuesta de choque térmico

HT: Heterocigoto

I κ B α : Inhibidor específico de kapa B

ICAM: Moléculas de adhesión intracelular

IL-4: Interleuquina 4

INF- γ : Interferón

IP-10: Proteína inducible por interferón

ISAMs: Moléculas de adhesión molecular

I-TAC: Quimiocina inducida por interferón

L-NMMA: N^G-monometilarginina

LC: Sistema *LightCycler*

LDL: Lipoproteínas de baja densidad. *Low density lipoproteins*

LOX-1: *lectin-like oxidized LDL receptor*

LOX-1: Receptor de LDL oxidada

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MIG: Monoquinas inducidas por interferón

MTHFR: Metiletetrahidrofolato reductasa

MMP-9: Metaloproteinasa

NFκB: Factor de transcripción kapa

NK: Células *natural killer*

PAF: Factor de activación plaquetaria

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno

PCR: Proteína C reactiva

PERK: Proteína kinasa del retículo endoplásmico

PMN: Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAA: Proteína amiloide sérica

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

SDMA: Dimetilarginina simétrica

SNPs: Polimorfismo mononucleotídico. *Single Nucleotid Polymorphism*.

SRA: Receptor *scavenger*

TGF-β: Factor β de crecimiento transformante

tHcy: Homocisteína plasmática total

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF-α: Factor de necrosis tumoral

t-PA: Activador tisular de plasminógeno

TT: Genotipo homocigoto mutado para la mutación 677C>T

UPR: Respuesta a proteínas no plegadas. (Unfolded protein response)

VCAM: Moléculas de adhesión vascular

VISP y VITATOPS: Estudios de intervención. *Vitamin Intervention for Stroke Prevention*

WT: Genotipo homocigoto normal ó salvaje (*Wild Type*).

ÍNDICE

	Pág.
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	6
1.1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR y ATROSCLEROSIS	10
1.2 FACTORES DE RIESGO VASCULAR	27
1.2.1 Factores de riesgo vascular “ modificables”	28
1.2.2 Factores de riesgo vascular “no modificables”	31
1.3 HOMOCISTEÍNA	32
1.3.1 Metabolismo de la homocisteína	33
1.3.2 Causas de hiperhomocisteinemia (HHcy)	37
1.3.3 Hiperhomocisteinemia como factor de riesgo vascular	42
1.3.4 Mecanismos de acción de la homocisteína	44
1.4 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps)	58
1.5 GEN hsp70	66
1.6 LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS	69
2. <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	71
3. <u>OBJETIVOS</u>	73
4. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	75
4.1. SUJETOS	76
4.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO	77
4.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	79
4.4. REQUISITOS PREANALÍTICOS	79
4.5. VALORACIÓN DE RIESGO VASCULAR. CLASIFICACIÓN DE LOS SUJETOS PARTICIPANTES	80
4.6. ESTUDIO BIOQUÍMICO	82
4.7. MEDICIÓN DE HOMOCISTEÍNA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	82
4.8. MEDICIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA (PCR) POR ELISA	83
4.9. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)	84
4.10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Hsp70 LEUCOCITARIAS Y SÉRICAS	86
4.11. CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Anti-Hsp70 CIRCULANTES	87
4.12. CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Anti-Hsp60 CIRCULANTES	88
4.13. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE Y DE PMNs	89
4.14. ESTUDIO MOLECULAR DEL POLIMORFISMO 677C>T DE LA MTHFR	90
4.14.1. PCR-RFLP	90
4.14.2. PCR A TIEMPO REAL	92
4.15. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN Hsp70	95
4.15.1. Extracción de ADN de PMNs	95
4.15.2. Amplificación de la región reguladora	96
4.15.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados	98
4.15.4. Análisis de la secuencia	99

	Pág.
4.16. CÁLCULO DE FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS POLIMORFISMOS	100
4.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101
4.18. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO	101
4.19. INFORME DE RESULTADOS	102
5. <u>RESULTADOS</u>	103
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	106
5.2. ESTUDIO BIOQUÍMICO. VARIABLES ANALIZADAS	108
5.3. RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, HOMOCISTEÍNA y PROTEÍNA C REACTIVA	127
5.4. ESTUDIO MOLECULAR DEL POLIMORFISMO 677C>T DEL GEN QUE CODIFICA LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR)	130
5.5. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO 677C>T EN LOS NIVELES DE Hcy	136
5.6. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO 677C>T SOBRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps y ANTICUERPOS anti-Hsps)	139
5.7. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN HSP70	142
5.8. INFLUENCIA DE LOS SNPs DEL PROMOTOR DEL GEN hsp70 EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps y ANTICUERPOS anti-Hsps), HOMOCISTEÍNA Y PROTEÍNA C REACTIVA	150
5.8.1. SNPs: 326 A>C Y -27 G>C	
5.8.2. SNPs -97 C>T, -158 C>A, -189 G>A, -591 G>A y -615 G>A	
5.9. INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS -326 A>C, -27G>C EN LA RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps y ANTICUERPOS anti-Hsps), HOMOCISTEÍNA Y PROTEÍNA C REACTIVA	159
5.10. RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO y ANTICUERPOS anti-Hsps EN LA ATROSCLEROSIS	163
5.11. CLASIFICACIÓN FENOTIPOS POR EXPRESIÓN Hsp70	168
6. <u>DISCUSIÓN</u>	169
6.1. FACTORES DE RIESGO. CLASIFICACIÓN. CONCEPTO	170
6.2. INTERÉS FISIOPATOLÓGICO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS	172
6.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS UTILIZADOS. LIMITACIONES Y CONSIDERACIONES PREANALÍTICAS	175
6.4. ESTADO DE SALUD DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	180
6.5. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE PCR, tHcy, Hsps Y ANTICUERPOS anti-Hsps. RELACIÓN EN POBLACIÓN CON O SIN FACTORES DE RIESGO VASCULAR	182
6.6. POLIMORFISMO 677C>T. INFLUENCIA EN tHcy Y Hsps	190
6.7. POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN hsp70. INFLUENCIA EN LOS NIVELES DE Hsps Y ANTICUERPOS anti-Hsps	195
6.8. BIOLOGÍA DE LAS Hsps EN LA ATROSCLEROSIS	199
7. <u>RESUMEN</u>	202
8. <u>CONCLUSIONES</u>	205
9. <u>PROPUESTA</u>	208
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	210

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la enfermedad vascular es la principal causa de muerte en los países desarrollados, teniendo como base de la enfermedad procesos de aterosclerosis y de trombosis.

La aterosclerosis está considerada como una enfermedad inflamatoria crónica. La hipótesis fisiopatológica más aceptada es la de respuesta a la lesión. Se propone que el primer paso en la formación de la placa de ateroma es la denudación / disfunción endotelial. Cada lesión característica de aterosclerosis representa una fase diferente de un proceso crónico de la arteria, en el que se incrementan la permeabilidad a lipoproteínas, la adhesividad de leucocitos y plaquetas y la aparición de un estado procoagulante, así como la liberación de moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento.

Las células que intervienen en esta fase de respuesta inflamatoria son monocitos-macrófagos y linfocitos T (predominantemente del fenotipo CD4+).

Si la reactividad a las células T está implicada en la aterosclerosis, es importante identificar qué moléculas (autoantígenos) pueden ser candidatas para dirigir la respuesta y caracterizar la especificidad y el fenotipo funcional (proinflamatorio o regulador) de las células T que infiltran las placas de ateroma. Se ha propuesto un gran número de moléculas, entre las que se incluyen miembros de la familia de las proteínas de choque térmico (Hsps).

Por otra parte, numerosos estudios clínicos demuestran que la homocisteína plasmática total (tHcy) constituye un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y predice la mortalidad en pacientes con enfermedad coronaria arterial, así como la aparición de nuevos eventos cardiovasculares, independientemente de los factores de riesgo tradicionales.

El aumento moderado de homocisteína se debe a la disminución en la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo: homocisteína-S-metiltransferasa, cistationina- β -sintasa (*CBS*) y metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*). La disminución de la

actividad de estas enzimas se puede producir por alteraciones en su estructura primaria, por defectos de sus coenzimas o por mutaciones en los genes que codifican dichas enzimas.

Los mecanismos a través de los cuales la homocisteína podría causar daño vascular son diversos, entre los que se pueden citar: la conversión de homocisteína (Hcy) a Hcy-tiolactona, estrés del retículo endoplásmico (RE), estrés oxidativo e inducción de factores proinflamatorios.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realiza bien a partir del grupo sulfidrilo de la homocisteína, utilizando ión cobre como catalizador, ó bien a través de la formación de tioésteres muy reactivos (Hcy-tiolactona) que darían lugar a agregados con LDL. La captación de esos agregados por macrófagos en la pared del vaso, daría lugar a la formación de las células espumosas. Las ROS inactivan el óxido nítrico, potenciando el proceso aterosclerótico por vasoconstricción, agregación plaquetaria y adhesión de monocitos a la capa celular endotelial.

Por otra parte, la homocisteína induciría una situación de estrés en el retículo endoplásmico (RE), por acúmulo de proteínas con errores de plegamiento en el lumen del mismo, lo que activaría la expresión de una proteína kinasa del retículo endoplásmico (PERK) que suprime la síntesis proteica.

La denominada respuesta de choque térmico (HSR) es la principal reacción a la agresión ambiental y fisiopatológica. Tras sufrir la agresión celular, la síntesis proteica se ve profundamente alterada, cesando la síntesis de la mayoría de las proteínas e induciéndose otras, entre las que destacan las Hsps. Esta respuesta constituye un mecanismo de defensa, habiéndose detectado en diferentes condiciones patológicas, alteraciones en la expresión génica de las Hsps.

La expresión de la proteína kinasa PERK activa la transcripción de un grupo de caperona de la familia de las proteínas de choque térmico HSP70, la GRP78.

El papel citoprotector de las Hsp70, está documentado en una amplia variedad de enfermedades humanas, tales como desórdenes metabólicos, inflamación, infección e isquemia, por lo que podrían considerarse como marcadores de daño celular,

constituyendo el preludio de un sugerente potencial terapéutico, sobre todo, para controlar y prevenir complejas enfermedades multifactoriales.

Aunque la influencia precisa de las Hsps en la aterogénesis y en la arterioesclerosis no está aún bien definida, numerosos estudios están evidenciando una asociación entre expresión de Hsps y reactividad a Hsps e inducción de la respuesta inflamatoria que caracteriza el desarrollo de la aterosclerosis.

La comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la HSR, cobra gran trascendencia por su aplicabilidad en medicina.

En definitiva, el mejor conocimiento de los acontecimientos que conducen a la inducción y progresión de la aterosclerosis, y el desarrollo de estrategias que controlen estos procesos, podrían tener un significativo impacto en la salud humana.

1.1. **ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR y ATEROSCLEROSIS**

La enfermedad cardiovascular causa anualmente en Estados Unidos¹, un número de muertes que alcanza el 50% del total de fallecimientos, siendo superior al porcentaje de muertes ocasionadas por otras causas como: cáncer (30%), enfermedad pulmonar (5%), accidentes (5%), enfermedad hepática (1%), suicidios (1%), infecciones y otras causas (8%). Esta situación aumenta año tras año, alcanzando proporciones de epidemia. La situación en Europa y Asia² es similar. En España, aunque la tasa de mortalidad es menor, la enfermedad cardiovascular constituye también la primera causa de muerte. Datos recientes³ indican que a pesar de haberse producido un descenso en 2006 con respecto a 2005 en el número de muertes por enfermedad cardiovascular, éstas suponen el 32,5% del total de defunciones, tal y como se recoge en la figura 1.1-1.

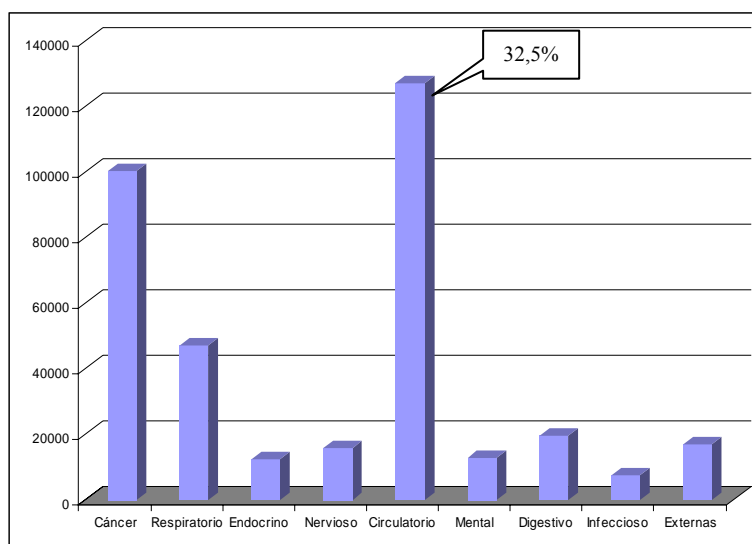


Figura 1.1-1. Porcentaje de mortalidad en España, por enfermedad³

Está documentado que existe un elevado número de personas asintomáticas con alto riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, por el hecho de poseer más de dos factores de riesgo clásicos, sobre los que no se realiza un control adecuado⁴, lo que ocurre en más del 60%.

Sin embargo y a pesar de los avances logrados en el conocimiento de la enfermedad cardiovascular, el estudio de factores de riesgo clásicos como hipertensión, tabaco,

diabetes e hipercolesterolemia, no llega a predecir exactamente un evento cardiovascular.

El término “*enfermedad cardiovascular*”, se utiliza generalmente para referirse a enfermedad cardíaca. Sin embargo este término resulta muy impreciso ya que engloba cualquier enfermedad de corazón y vasos sanguíneos. Esta imprecisión puede dar lugar a errores conceptuales sobre la prevalencia y la diversidad de estas enfermedades.

Más del 75% de todas las enfermedades cardiovasculares corresponden a enfermedades de la pared arterial¹. Así, el infarto de miocardio ó el ictus pueden producirse por oclusión de las arterias coronarias ó de la arteria cerebral.

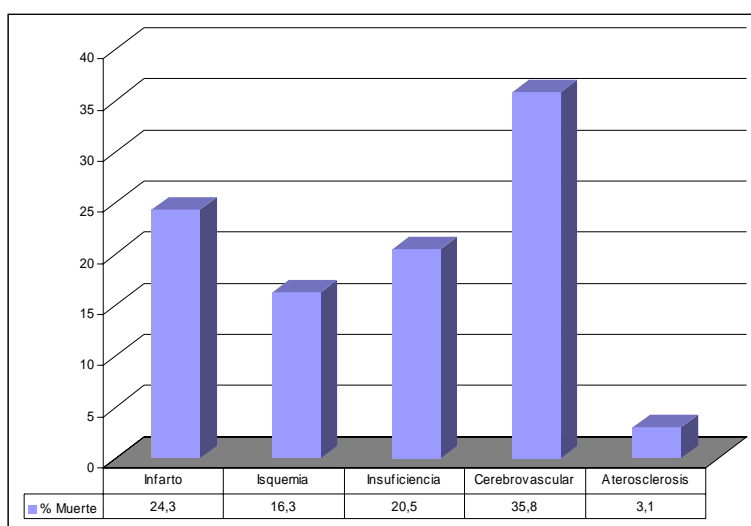


Figura 1.1-2. Porcentaje de mortalidad en España, causado por enfermedad cardiovascular³

El término “*arteriosclerosis*” se refiere de forma genérica al engrosamiento y endurecimiento de las arterias independientemente de su tamaño, mientras que el término “*aterosclerosis*” se circunscribe a arterias de mediano y gran calibre, cuando las lesiones se producen en la pared arterial, produciéndose las denominadas placas de ateroma, compuestas por depósitos de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias. Los términos griegos “*esclerosis*”, en referencia al endurecimiento de la capa íntima arterial y “*athere*” (gachas) en relación a la acumulación de lípidos, definen las principales características de la lesión.

La aterosclerosis afecta al árbol arterial, pudiendo lesionar fundamentalmente aquellas arterias que irrigan corazón, cerebro y extremidades inferiores, como coronarias, carótidas, vertebrales, cerebrales, aorta, ilíacas y femorales. Sus complicaciones asociadas -enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular periférica e ictus- son las principales causas de morbi-mortalidad en la mayoría de las sociedades occidentales.

Ya a mediados del siglo XV, los primeros anatomopatólogos del Renacimiento Italiano documentan la presencia de placas calcificadas, engrosamiento y depósitos blandos, denominados posteriormente ateromas, en aorta y en arterias largas. En 1543, Versalius publica, basado en sus disecciones, su atlas ilustrado de anatomía humana⁵, en el que aparecen dibujos de placas en arterias. En 1835, Lobstein⁶ introduce por primera vez el término arteriosclerosis, para referirse al engrosamiento de las placas arteriales con contenido de calcio. A mediados del siglo XIX, Rokitsky⁷ y Virchow⁸, analizan el proceso de aterogénesis. Mientras que Rokitsky atribuye el engrosamiento encontrado al depósito de componentes de la sangre en la superficie de la íntima, Virchow da el nombre de “endoarteritis crónica deformante nodosa” a los cambios arteriales producidos en la arterioclerosis, describiendo cambios inflamatorios e infiltración de grasa en la íntima arterial, degeneración de la pared arterial, fibrosis, calcificación y ateroma con depósitos cristalinos y sugiere que la permeabilidad alterada de la íntima arterial permite una mayor filtración de plasma y depósito de grasa en asociación con los cambios degenerativos de la pared arterial. En 1924 Aschoff⁹, describe depósitos de cristales de colesterol en ateromas de aorta.

En los primeros años del siglo XX, se realizan numerosos intentos, aunque sin éxito para conseguir *in vivo* la producción de placas de ateromas por infusión de cultivos bacterianos. En 1908, Ignatowsky¹⁰ comienza a interesarse por el papel que la dieta pueda tener en la aterogénesis, siendo el primero en introducir en la dieta de animales vegetarianos como el conejo, la ingesta de carne, huevos y leche con el objeto de conseguir placas de ateromas, provocando, tras una larga ingesta de la dieta, ateromas en aorta, pero también cirrosis, nefritis, albuminuria. Su conclusión: “la ingesta de colesterol provoca aterogénesis”.

Años más tarde, en Estados Unidos, Newburg¹¹ repite el mismo experimento, pero eliminando de la dieta, mediante extracción orgánica, todo el colesterol y la grasa. El producto protéico obtenido produce idénticas placas a las observadas por Ignatowsky años antes, lo que le lleva a concluir que la dieta protéica, más que el colesterol, es la responsable de la aterogénesis producida in vivo, por lo que continua su trabajo realizando una infusión de aminoácidos puros, con objeto de conocer que aminoácido es el causante del depósito de placas¹². Sin embargo éste no se produce, y de nuevo los animales desarrollan nefritis y albuminuria especialmente tras la infusión de cisteína, tirosina ó triptófano.

Hasta 1990, la aterosclerosis se considera como una enfermedad degenerativa producida por depósito de lípidos, y definida como una enfermedad arterial muy prevalente caracterizada por discretos engrosamientos de la íntima, debido a depósitos lipídicos y de colágeno. Tradicionalmente la patofisiología de la aterosclerosis se reduce a la hipótesis del colesterol, y de hecho los niveles de colesterol y LDL-colesterol plasmáticos, tienen un indudable valor como marcador de riesgo de futuros eventos cardiovasculares. Sin embargo muchos individuos que padecen un infarto de miocardio, presentan niveles de colesterol y LDL-colesterol inferiores a los recomendados¹³. Es indudable que a la vista de los hallazgos clínicos es necesario mejorar la capacidad de predecir el riesgo cardiovascular. Aunque el colesterol está considerado como factor causal en aterosclerosis¹⁴ y el conocimiento de las vías moleculares que regulan el colesterol ha permitido el desarrollo de tratamientos con efecto reductor de los niveles de colesterol, no obstante existe controversia acerca de los mecanismos a través de los cuales los altos niveles de LDL-colesterol produce aterosclerosis¹⁵.

En los últimos 15 años, el conocimiento de la aterosclerosis ha permitido llegar a definir la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria difusa de la capa interna arterial, cuya lesión contiene células del sistema inmunológico capaces de causar y dirigir una respuesta inflamatoria.

La idea actual del origen inflamatorio de la aterosclerosis, considerada como “respuesta al daño”, fué pronunciada por Ross¹⁶, en 1999. De acuerdo con esta hipótesis se consideran factores causantes de inflamación en aterosclerosis a: dieta rica en grasas

saturadas, obesidad, hábito tabáquico, hiperglucemia, resistencia a insulina, lipoproteínas de baja densidad (LDL), LDL-oxidada, hiperhomocisteinemia, hipertensión, angiotensina II elevada y agentes infecciosos como virus herpes y *Chlamydia pneumoniae*.

Aunque el inicio en el proceso de la aterosclerosis permanece sin aclarar, parece que el primer paso es una disfunción endotelial. Las células endoteliales juegan un importante papel en la función del sistema vascular.

Estas células forman una monocapa que cubre el sistema vascular. Su integridad estructural y funcional es fundamental para mantener la homeostasis de la pared del vaso. La estructura de las células endoteliales es poligonal, habitualmente de un tamaño menor de 1 μm y elongadas en dirección paralela al eje del vaso. Muchas poseen vesículas pinocíticas en su citoplasma, abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico granular bien desarrollado y aparato de Golgi. El área de contacto entre células

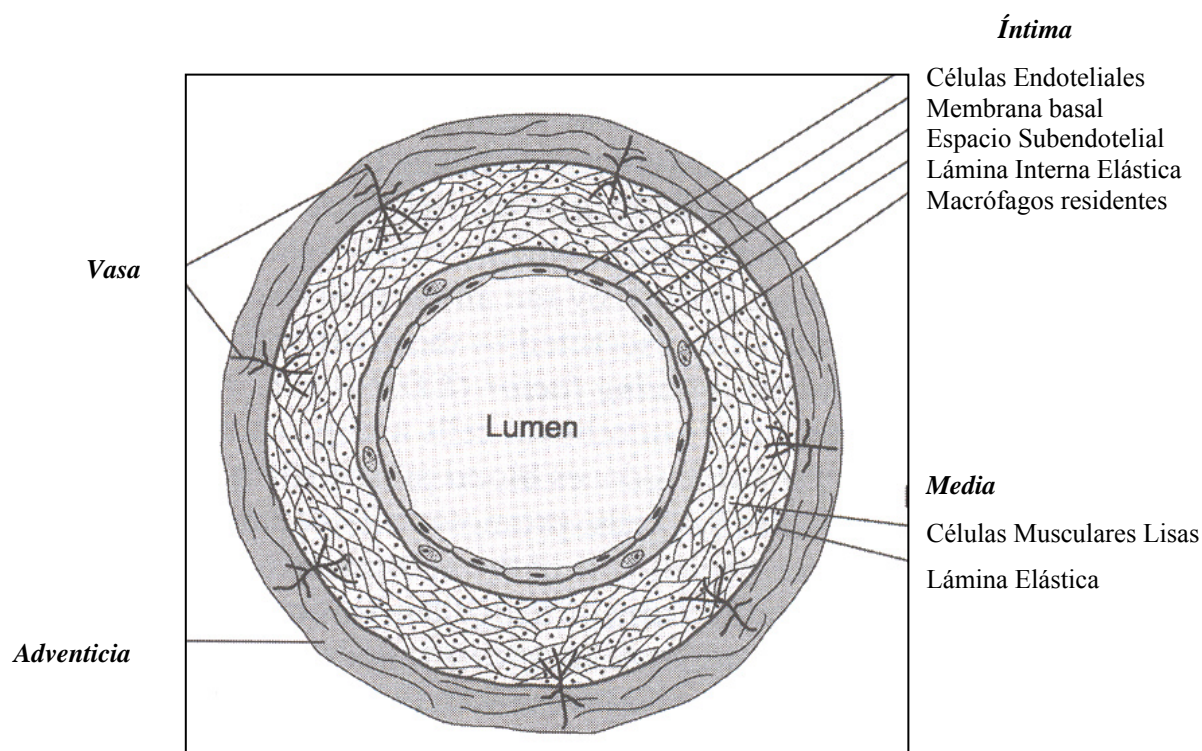


Figura 1.1-3. Sección de arteria humana. Ilustración tomada de Maciejko¹⁷

endoteliales varía desde el simple contacto entre las membranas celulares, hasta la formación de puentes intracelulares bien definidos (desmosomas). El tamaño de la membrana basal (*Fig 1.1-3*) que separa las células endoteliales del espacio subendotelial en la estructura del vaso, depende no solo del tamaño de la arteria, sino de la edad del individuo. Así desde el nacimiento y en los primeros años de la vida, el espacio subendotelial en las arterias coronarias es muy pequeño. A partir de la primera década y en la edad adulta comienza a aumentar, debido a la acumulación de lípidos, células inflamatorias y tejido conectivo.

Las células endoteliales poseen propiedades sintéticas, metabólicas y mecánicas. Sirven como membrana semipermeable, controlando la transferencia de pequeñas y grandes moléculas hacia la pared arterial y a través de las paredes de capilares y venas. Son responsables de mantener un interespacio sangre-tejido no trombogénico, regulando la trombosis, la trombolisis y la adhesión plaquetaria. Además modulan el tono vascular y el flujo sanguíneo, modifican lipoproteínas y regulan el crecimiento de otras células, especialmente de células musculares lisas. En relación con la aterosclerosis, las células endoteliales son capaces de regular reacciones inmunes e inflamatorias sintetizando factores químicos capaces de controlar las interacciones de leucocitos mononucleares con la pared del vaso sanguíneo.

El endotelio responde a estímulos externos de daño celular, ajustando sus funciones fisiológicas, o sintetizando nuevas proteínas. En condiciones patológicas la pérdida del equilibrio homeostático produce un incremento de la actividad protrombótica con aumento de la síntesis de sustancias pro-inflamatorias y vasoconstrictoras. Por tanto, el primer paso en el proceso de la aterosclerosis es la disfunción endotelial.

El término genérico “*disfunción endotelial*” se aplica para describir cualquier cambio de la función endotelial (***estimulación o activación***) ante un estímulo o daño externo.

Así, el término “*estimulación endotelial*” se refiere a la respuesta celular rápida y reversible del endotelio ante una estimulación, independiente de la síntesis de nuevas proteínas.

Por el contrario, el término “*activación endotelial*”, se refiere a la alteración de la expresión génica de las células endoteliales, en respuesta a estímulo o daño celular,

dando lugar a la síntesis de nuevas proteínas. Esta respuesta es irreversible y puede durar horas e incluso días. La inducción de la activación endotelial se produce por numerosos factores de riesgo y situaciones clínicas que se han relacionado con la formación precoz y progresión de las lesiones para dar lugar a la aterosclerosis¹⁶. Algunas de estas situaciones, se recogen en la figura 1.1-4.

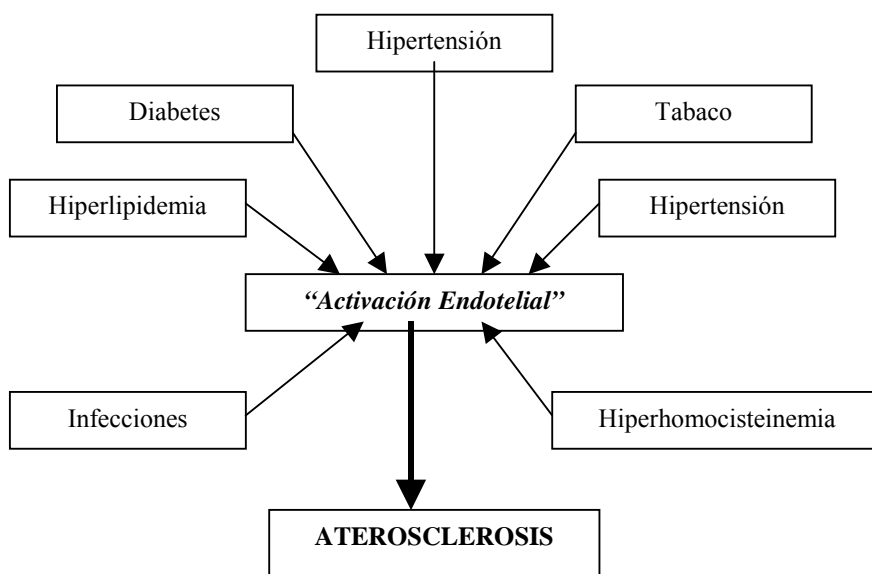


Figura 1.1-4. Causas de activación endotelial

Aunque no está bien definido, se piensa que el entorno aterogénico arterial se podría generar a partir de las células endoteliales activadas¹⁸.

Como ya se ha descrito, una de las funciones más importantes de las células endoteliales es regular el flujo sanguíneo en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Esta regulación está mediada por la generación de vasodilatadores: prostaciclina (PGI₂) y óxido nítrico (NO) y vasoconstrictores: endotelina (ET-1) y angiotensina II, así como la síntesis de anticoagulantes y factores fibrinolíticos como el activador tisular de plasminógeno (t-PA), heparán sulfato y trombomodulina, factores que mantienen el equilibrio homeostático entre fibrosis y fibrinólisis.

La prostaciclina PGI₂, metabolito del ácido araquidónico, es vasodilatador y antiagregante plaquetario. El óxido nítrico, identificado inicialmente como factor de relajación endotelial (EDRF), es anti-inflamatorio, inhibe la agregación plaquetaria y promueve la vasodilatación.

La endotelina, proteína de bajo peso molecular (21 aminoácidos), induce vasoconstricción prolongada y promueve el crecimiento de células del músculo liso.

La angiotensina II, proteína de 452 aminoácidos, causa vasoconstricción y es pro-inflamatoria. La angiotensina II se genera mediante dos sistemas similares, aunque algo diferentes, como son: el sistema renina-angiotensina circulante y el tisular. El sistema tisular produce localmente angiotensina II, involucrada en diferentes actividades autocrinas y paracrinas tisulares, incluyendo aterogénesis¹⁹.

Así mismo, las células endoteliales tienen la capacidad de producir el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) y el factor tisular, promoviendo la trombosis.

Las células endoteliales disfuncionales son más permeables a las lipoproteínas LDL y otras lipoproteínas que las células normales. Esta respuesta del endotelio activado, facilita e incrementa el flujo de las LDLs hacia el espacio subendotelial (Insudación), quedando retenidas²⁰ mediante su adherencia a constituyentes de la matriz extracelular como heparán sulfato y proteoglicanos, formando agregados coalescentes²¹, acumulándose en el espacio subendotelial²². Estas lipoproteínas son oxidadas por radicales libres liberados del metabolismo celular, lo que da lugar a la expresión de moléculas de adhesión tales como P-selectina y VCAM-1 (moléculas de adhesión vascular), en la superficie de las células endoteliales en el espacio subendotelial²³. La oxidación se produce por mediación del anión superóxido (O₂⁻), liberado por células del músculo liso activadas y por macrófagos de la pared vascular²⁴.

Algunos estudios cinéticos realizados con lipoproteínas marcadas, en modelos de aterosclerosis animal, indican que el sitio de inicio de la formación del ateroma coincide con el sitio arterial de estancia prolongada de las LDL²⁵. El tiempo de estancia prolongado de las LDLs en el espacio subendotelial, incrementa su susceptibilidad a la oxidación y otras modificaciones químicas.

Por otra parte, la endotelina es capaz de aumentar la insudación de las LDLs activando la vía del receptor específico acoplado a células endoteliales²⁶. Algunos de los receptores de lipoproteínas que intervienen en estos procesos son, entre otros LDL-receptor (LDLR), VLDL-receptor (VLDLR), proteína relacionada con el receptor de LDL (LRRP) y el receptor de asialoproteínas²⁷.

Así mismo, la generación local de angiotensina II, aumenta la expresión de NADH-oxidasa en la célula endotelial activada, dando lugar a la producción de anión superóxido²⁸, aumentando la oxidación de las LDLs por estímulo de la actividad lipooxigenasa en macrófagos²⁹. En condiciones normales, el anión superóxido es neutralizado por la superóxido dismutasa (SOD), enzima producida por el endotelio normal. La expresión de esta enzima se reduce cuando se produce una disfunción endotelial³⁰.

Las LDLs oxidadas actúan como moléculas pro-inflamatorias induciendo la síntesis endotelial de citoquinas como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), mitógeno que provoca la división celular de macrófagos y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)³¹, citoquina quimioattractante o quimiocina que promueve la migración de monocitos al espacio subendotelial, hacia el ateroma en formación, favoreciendo la adherencia de las células inflamadas a la íntima endotelial³². Simultáneamente se produce la conversión de monocitos a macrófagos, controlada por M-CSF y la activación de macrófagos, replicación, expresión de receptores *scavenger* y secreción de citoquinas inflamatorias. La expresión de receptores *scavenger*, da lugar a la captación del exceso lipídico, de forma que las LDLs oxidadas son fagocitadas por macrófagos activados, que residen en la pared del vaso, a través de receptores *scavenger* localizados en su superficie, dando lugar a la formación de células espumosas³³. La expresión de dichos receptores está regulada por citoquinas³⁴ como: Interleuquina 4 (IL-4), factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor β de crecimiento transformante (TGF- β), interferón (IFN- γ) y angiotensina II³⁵, sintetizadas por células T y células endoteliales en respuesta al daño celular. IFN- γ y TNF- α disminuyen la expresión de

receptores *scavenger*, mientras que IL-4 y TGF- β aumentan su expresión. Algunos de los receptores *scavenger* identificados incluyen: CD36³⁶, receptor de LDL-oxidadas (LOX-1)³⁷ y receptores A-1 y A-2 (SRA-1 y 2)³⁸.

El secuestro de las lipoproteínas oxidadas constituye un punto importante en la protección inicial ejercida por macrófagos.

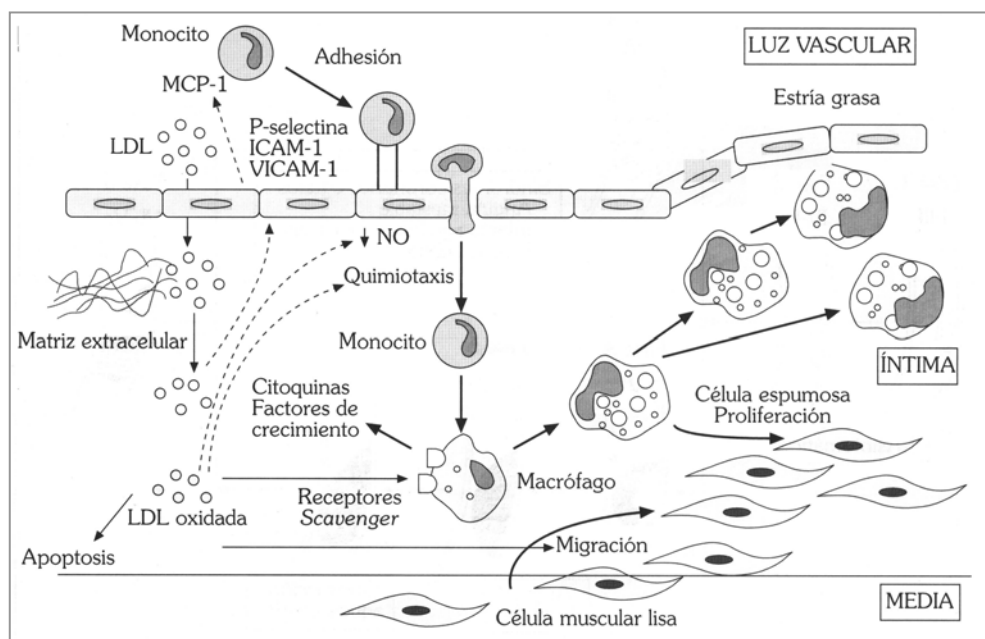


Figura 1.1-5. Fases en el desarrollo de la enfermedad. Tomada de Cairols et al⁶⁹

Otro factor pro-inflamatorio componente de las LDL oxidadas, el factor de activación y agregación plaquetaria (PAF), estimula la producción y secreción de citoquinas por macrófagos³⁹. La existencia de una relación significativa entre [colesterol-LDL] y los niveles de PAF-1, junto con el aumento de los niveles PAF-1 en relación con la enfermedad, sugiere que el PAF-1 podría promover la enfermedad⁴⁰.

Simultáneamente a la insudación y oxidación de las LDLs, en el espacio subendotelial se produce la adherencia de leucocitos mononucleares (monocitos y células T), a la superficie endotelial. El endotelio normal es capaz de resistir esta adhesión⁴¹, mientras que el endotelio activado no, debido en parte a la disminución en la producción de

óxido nítrico (NO), ya que las LDLs inhiben la actividad óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

El NO reduce selectivamente la expresión endotelial de moléculas de adhesión y disminuye la síntesis de citoquinas inducidas por el endotelio activado, interfiriendo con el factor de transcripción kappa B (NF κ B) y aumentando la producción del inhibidor específico de kappa B (I κ B $_{\alpha}$)⁴². El NF κ B regula numerosos genes implicados en la inflamación, particularmente en la aterosclerosis. Las citoquinas expresadas por el endotelio activado, inician también la expresión de moléculas de adhesión, reguladas transcripcionalmente.

Tras la adhesión celular, se produce el rodamiento hasta conseguir una adhesión firme. En este proceso participan cuatro familias de moléculas de adhesión, que incluyen: 1) selectinas, 2) la gran familia de moléculas de adhesión inmunoglobulinas (ISAMs), 3) adresinas y 4) integrinas^{43,44,45}. Las selectinas (P-selectina y E-selectina) y las ISAMs son producidas por células endoteliales⁴³, mientras que adresinas e integrinas son producidas por leucocitos mononucleares⁴⁶, con el fin de unir selectinas e ISAMs a la superficie endotelial. Tras la activación endotelial, se produce la expresión de P-selectina, que se acumula en el citoplasma de la célula endotelial⁴⁷. P-selectina también se sintetiza y expresa en la superficie de plaquetas activadas. Mientras que la síntesis y expresión de P-selectina se produce de forma rápida, la producción de E-selectina es un proceso más lento⁴³.

La superfamilia de las ISAMs producidas, están involucradas en la localización de leucocitos. Forman parte de esta familia las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, ICAM-2) y la molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1) y se sintetizan en un proceso dependiente de citoquinas (IL-1-6 y TNF α).

Las adresinas e integrinas sintetizadas en la superficie de leucocitos, son capaces de unir en su región rica en carbohidratos, las selectinas e ISAMs de la superficie del endotelio activado. Las integrinas están compuestas por dos subunidades (α y β), siendo la subunidad β la que interviene mayoritariamente en la unión a la célula endotelial. Así la

β -1 Integrina se une a VCAM-1, mientras que la subunidad β -2 se une a las ICAM-1 y ICAM-2⁴³.

Una vez producida la adhesión firme, se inicia el proceso de trans migración (quimiotaxis), proceso dinámico dependiente de energía, en el que intervienen moléculas como citoquinas y quimiocinas, secretadas por las células T.

Las quimiocinas están constituidas por dos familias alfa y beta. Las α -quimiocinas como IL-8, son potentes quimiotácticos para neutrófilos, mientras que las β (MCP-1) lo son para monocitos y células T. La MCP-1 promueve la trans migración de monocitos al espacio subendotelial. Existe un tercer grupo de quimiocinas, sintetizadas por células T, que pueden inducir atracción linfocitaria y acumulación en el desarrollo del ateroma. Estas quimiocinas incluyen la proteína 10 inducible por interferón (IP-10), I-TAC y monoquinas inducidas por interferón- γ (MIG)⁴⁸.

En síntesis, en los procesos de contacto, rodamiento, adhesión y trans migración, están involucradas selectinas y adresinas, ISAMs e integrinas y quimiocinas.

Por otra parte, TNF- α e IL-1 son capaces de provocar otros procesos inflamatorios pro-aterogénicos, como: 1) inhibición de la lipoproteína lipasa, causando un aumento de niveles de VLDL e hipertrigliceridemia⁴⁹, 2) inducción de la interleuquina 6 (IL-6) capaz de aumentar la producción hepática⁵⁰ de proteínas reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR), que además de ser un marcador de inflamación, puede ejercer un efecto directo en el reclutamiento de leucocitos en la pared del vaso⁵¹.

Otra citoquina, la IL-12, sintetizada por macrófagos activados, pudiera tener un papel en la transformación de células T en células T-helper. La mayoría de las células T de las lesiones en la aterosclerosis, reconocen antígenos y citoquinas presentados por macrófagos activados y células endoteliales. Muchas de estas células T exhiben en su superficie marcadores indicativos de un estado crónico de activación, (o de memoria)⁵². La IL-12 parece ser un importante activador de la estimulación y memoria de las células T-helper. Las células T-helper sintetizan IFN- γ , IL-2 y TNF- α y β , citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a la activación de macrófagos y del endotelio⁵³. Esta información soporta la teoría de un mecanismo inmune en la biología vascular de la

aterosclerosis, lo que sugiere que una modulación inmune, o una posible inmunización puede reducir la progresión de la enfermedad.

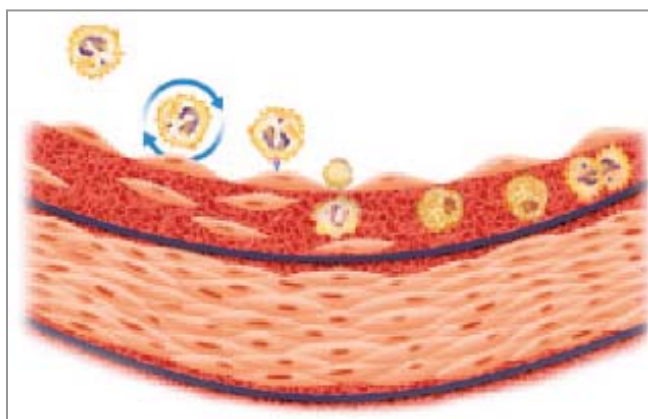


Figura 1.1-6 .- Inicio de la aterosclerosis. Ilustración tomada de Packard⁵⁴ y Libby⁵⁵

El avance del ateroma está marcado por la migración de las células musculares lisas desde la media al espacio subendotelial, donde comienza su proliferación y transformación. La migración y proliferación de las células musculares lisas, constituye el principal cambio de la íntima durante el desarrollo de la capa fibrosa que rodea el ateroma¹⁶. Las células musculares lisas son responsables de la producción y secreción de proteínas de la matriz extracelular como colágeno y elastina, componentes fibrosos de la lesión aterosclerótica. La quimiotaxis de las células musculares se inicia por la acción de citoquinas como IL-1 y TNF- α . La activación de las células musculares lisas en la media arterial, permite la expresión de enzimas especializadas en la degradación de proteínas de la matriz de la pared vascular, lo que facilita la penetración de las células musculares lisas en la íntima y la estimulación de la angiogénesis⁵⁶. Coincidiendo con esta migración, las plaquetas se adhieren a la superficie de las células endoteliales activadas, cuya producción disminuida de NO, PGI2 y t-PA y aumento de síntesis de endotelina y de PAI-I, favorece la vasoconstricción, reduce la fibrinólisis y aumenta la adhesión plaquetaria, dando lugar a la síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), potente quimiotáctico⁵⁷ de células musculares lisas. El PDGF puede ser secretado por macrófagos activados¹⁶.

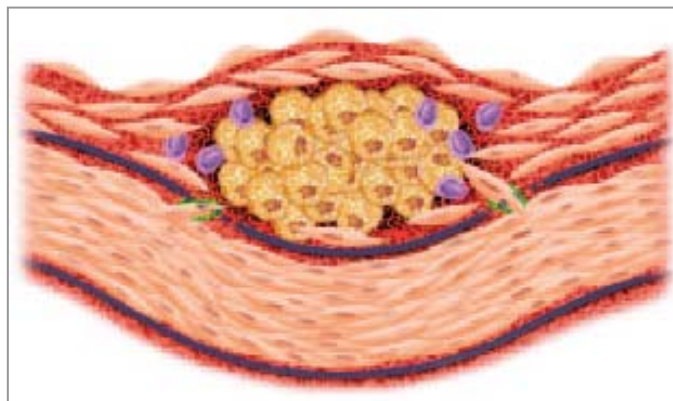


Figura 1.1-7 .- Avance de la aterosclerosis. Ilustración tomada de Packard⁵⁴ y Libby⁵⁵

El proceso inflamatorio no solo conduce a la aterosclerosis, sino que puede iniciar complicaciones clínicas, por ruptura de la capa fibrosa. La estructura de la capa es tejido conectivo con células musculares lisas maculadas. La inestabilidad de la placa ó la propensión para causar un evento vascular, depende de su composición más que de su tamaño. Las placas inestables, poseen una capa fibrosa delgada con pocas células musculares lisas y un gran *core* lipídico, mientras que las placas estables poseen una capa gruesa con un *core* lipídico menor. Además del número de células musculares lisas, la integridad estructural de la capa fibrosa, dependerá de la cantidad de colágeno y elastina sintetizada por las células musculares lisas. La proliferación de células musculares lisas está influenciada por el IFN- γ producido por las células T activadas. Así el IFN- γ es capaz de inhibir su crecimiento, lo que daría lugar a la muerte programada de esas células (apoptosis)⁵⁸. En segundo lugar IFN- γ es capaz de parar la síntesis de colágeno, elastina y proteoglicanos producidos por las células musculares lisas^{50, 59} lo que daría lugar al inicio de la apoptosis.

Por otra parte una concentración elevada de PDGF y TGF- β , puede activar las células musculares lisas, induciendo su proliferación, síntesis de colágeno y quimiotaxis. Por tanto, las consecuencias clínicas dependerán de la estructura de la capa fibrosa y del equilibrio entre la actividad de las distintas citoquinas y factores de crecimiento implicadas en la formación del ateroma.

La estructura de la capa fibrosa depende también de la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) de la matriz, proteasas producidas y secretadas por macrófagos activados y posiblemente por células musculares lisas⁶⁰. El incremento de tales proteasas se induce por LDL-oxidadas, citoquinas, estrés hemodinámico y posibles agentes infecciosos^{61,62}. Las MMPs incluyen collagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas, metaloelastasas y otras metaloproteinasas unidas a membrana.

Se postula que la predisposición del ateroma a la ruptura, depende de la degradación de las proteínas de la matriz, lo que implica que estas enzimas contribuyen a la desestabilización ó ruptura de la placa de ateroma⁶³. La vulnerabilidad de la placa depende de la activación de proteasas, pudiendo involucrar actividades de metaloproteinasas (MMPs)⁶⁴ y serina proteasa⁶⁵.

Recientemente se ha demostrado que el *core* necrótico unido a la placa hemorrágica en la lesión, es el sitio preferente de conversión de plasminógeno a plasmina (involucrada en la activación de pro-MMPs⁶⁶, de forma que la plasmina acumulada en el *core* es capaz de degradar proteínas de estrés (HSP27) secretadas por las células musculares lisas (VSMC)⁶⁷, evidenciando un conflicto entre las VSMC sintetizadas por la matriz extracelular y el *core* proteolítico.

Una vez rota la placa se formará bien un trombo oclusivo dando lugar a manifestaciones clínicas o en la mayoría de los casos, un trombo que no producirá la oclusión total ni causará síntomas. La presencia de otros factores trombogénicos podrá modificar la extensión y duración del trombo, lo que dará lugar a diferentes manifestaciones clínicas⁶⁸.

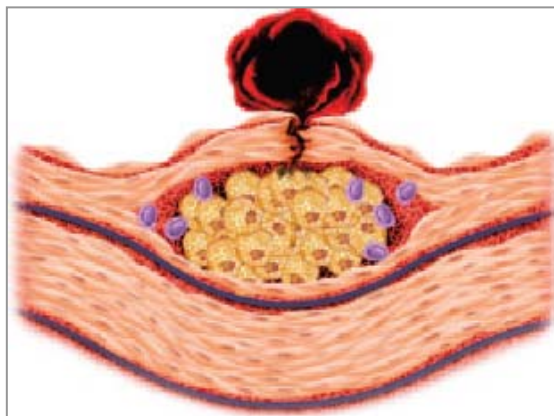


Figura 1.1-8 .-Ruptura de la placa en aterosclerosis. Ilustración tomada de Packard⁵⁴ y Libby⁵⁵

Clínicamente, el desarrollo de la aterosclerosis se produce a lo largo de la vida, y de acuerdo con Fuster⁶⁸, se clasifica en 5 fases, como recoge la figura 1.1-9.

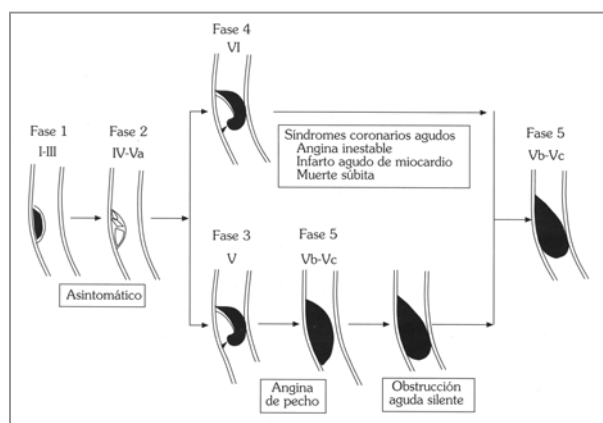


Figura 1.1-9. Fases en el desarrollo de la enfermedad. Tomada de Cairols y cols⁶⁹

En la fase 1, la pared arterial no está engrosada y no hay estenosis. Esta fase que ocurre generalmente en menores de 30 años, comprende 3 tipos de lesiones (I-III), y se caracteriza por la presencia en la zona subendotelial de macrófagos cargados de lípidos ó infiltración de células espumosas, denominada “lesión tipo I”, que se transforman en

placas infiltradas por células musculares y depósitos de lípidos extracelulares, denominada “lesión tipo II”. Se producen lesiones de tipo III, cuando alrededor de las fibras musculares, aparece depósito de tejido conjuntivo, fibrillas y acúmulo de lípidos. La fase 2 suele ser asintomática, aunque se puede acompañar de síntomas clínicos de isquemia estable. Se caracteriza por la desestructuración de la íntima y formación del núcleo lipídico, denominada “lesión tipo IV”, y presencia de tejido fibroso abundante que recubre el núcleo lipídico (lesión tipo Va). Estas lesiones, aunque no producen estrechamiento en la luz de la arteria, suelen ser la base de fisuras o roturas origen de fases posteriores. Las fase 3 y 4 son consecuencia de la rotura de la capa fibrosa que cubre el núcleo lipídico, dando lugar a la formación de un trombo mural que puede ocluir parcial (fase 3) ó completamente (fase 4) la luz de la arteria, apareciendo sintomatología clínica.

En la última fase, la organización del trombo por tejido conectivo y los depósitos de calcio, dan lugar a una lesión calcificada (Vb) o fibrótica (Vc) si predomina la fibrosis, dando lugar a la reducción del núcleo lipídico. En esta fase 5 se produce un progresivo aumento de la oclusión, aumento de las manifestaciones isquémicas y mayor predisposición a sufrir grietas y nueva formación de trombos.

1.2 FACTORES DE RIESGO VASCULAR

Se entiende como “factor de riesgo” cualquier hábito ó característica que sirve para predecir la probabilidad que tiene un individuo de desarrollar una determinada enfermedad. La existencia de un factor de riesgo no implica obligatoriamente una relación causa-efecto con la enfermedad⁶⁹. El grupo de trabajo del estudio “*Framingham Heart Study*”⁷⁰, introduce el término “**Factor de Riesgo Vascular**” para referirse al conjunto de rasgos, factores y características que predisponen al desarrollo de la aterosclerosis.

La consideración de “factor de riesgo vascular” y su clasificación fue revisada en 1996, aplicándose criterios de evidencia de beneficio, de que una acción intervencionista proporcione resultado favorable para el individuo⁷¹, quedando establecidas cuatro categorías:

- **Categoría I:** Factores para los que existe evidencia de que la intervención disminuye el riesgo, denominados “*verdaderos*” factores de riesgo. Se incluyen en esta categoría: tabaquismo, niveles de LDL colesterol elevados, dietas ricas en ácidos grasos saturados, hipertensión e hipertrofia ventricular izquierda.
- **Categoría II:** Factores para los que la intervención disminuye el riesgo vascular, identificados como factores de riesgo “*cualificados*”. Se incluyen: Diabetes mellitus, niveles disminuidos de HDL colesterol, hipertrigliceridemia y sedentarismo.
- **Categoría III:** aquellos para los que existe una asociación estadística con el incremento de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y que su modificación posiblemente puede disminuir el riesgo. Incluye: Factores psicosociales, Lipoproteína (a) elevada, marcadores inflamatorios, e Hiperhomocisteinemia, identificados como factores de riesgo “*candidatos*”
- **Categoría IV:** aquellos que no son modificables. Incluye: Edad, sexo, antecedentes familiares de enfermedad, marcadores genéticos y estatus socioeconómico bajo. Identificados como factores de riesgo “*no-modificables*”

No obstante en general se puede hablar de factores de riesgo modificables (categoría I a III) y no modificables (categoría IV). La presencia de varios factores de riesgo en un mismo individuo proporciona un aumento del riesgo según un efecto multiplicativo⁶⁹.

1.2.1 Factores de riesgo vascular "modificables"

➤ *Hipercolesterolemia*

Constituye junto con la diabetes, el tabaco y la hipertensión arterial, uno de los principales factores de riesgo vascular, habiéndose demostrado la asociación entre colesterol total sérico y cardiopatía isquémica^{70,72}. El valor predictivo del colesterol disminuye con la edad, siendo realmente bajo a partir de la sexta década de la vida. El riesgo de hipercolesterolemia se produce a espensas del colesterol-LDL. Su disminución reduce significativamente la morbi-mortalidad cardiovascular^{73,74}.

➤ *Hipertensión arterial (HTA)*

La HTA es un importante factor de riesgo, independiente de la edad y el sexo. Las cifras de presión arterial tanto sistólica como diastólica, se correlacionan con la incidencia de enfermedad coronaria e ictus^{72,75}. El papel de la HTA en la aterosclerosis no se conoce bien, aunque parece que el exceso de presión puede dañar el endotelio, aumentando su permeabilidad⁶⁹.

➤ *Tabaquismo*

El consumo de cigarrillos aumenta el riesgo de cardiopatía isquémica, ictus, enfermedad arterial de miembros inferiores y muerte súbita⁷⁶ y provoca la lesión del endotelio por acción del monóxido de carbono circulante, aumento de fibrinógeno y factor VII de la coagulación, aumento de adherencia y agregación plaquetaria, aumento de oxidación de la LDLs y descenso de la concentración de HDL⁶⁹.

➤ *Diabetes Mellitus*

La presencia de diabetes mellitus, predispone para la enfermedad aterotrombótica vascular, especialmente para la cardiopatía isquémica y enfermedad arterial de miembros inferiores. Las complicaciones ateroscleróticas es la principal causa de muerte entre los diabéticos⁷⁷.

➤ *Hipertrigliceridemia*

Los resultados obtenidos en estudios prospectivos son contradictorios, dado el carácter heterogéneo de la hipertrigliceridemia⁶⁹. Aunque controvertido, la hipertrigliceridemia se ha considerado como un factor de riesgo independiente⁷⁸.

➤ *Factores hemostáticos*

La concentración de fibrinógeno se asocia con el riesgo de cardiopatía isquémica e ictus, aunque no está claro si es un factor causal o un marcador preclínico de enfermedad aterotrombótica⁷⁹.

Se ha demostrado asociación entre riesgo vascular e incremento de factores de la coagulación, como son el factor VII, el factor von Willebrand, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1)⁸⁰.

➤ *Marcadores Inflamatorios*

Se asocian con la presencia de aterosclerosis marcadores como: IL-6, fibrinógeno, proteína C reactiva (PCR), proteína amiloide sérica A (SAA) ó moléculas de adhesión (ICAMs). El marcador mas estudiado es la PCR. Se ha demostrado que sujetos con enfermedad vascular establecida y con niveles elevados de PCR tienen peor pronóstico. Así mismo se ha demostrado, en sujetos sin evidencia de enfermedad cardiovascular, la asociación entre niveles elevados de PCR y la aparición de episodios coronarios⁸¹.

➤ *Homocisteína*

La presencia de niveles moderadamente elevados de homocisteína se ha asociado con determinadas enfermedades vasculares.

La homocisteína y su metabolismo han sido objeto de especial interés a partir de los años 60, cuando se describe por primera vez en pacientes con homocistinuria clásica, por deficiencia de la enzima cistation- β -sintasa⁸², en los que los niveles de homocisteína se encuentran muy elevados, que presentan ectopia del cristalino, signos y síntomas derivados de afectación ósea y neurológica, con retraso mental, así como oclusiones vasculares graves, trombosis arteriales y venosas⁸³. En estos pacientes, la suplementación de la dieta con vitaminas B y folato reduce de forma efectiva los niveles de tHcy, disminuyendo el riesgo de enfermedad cardiovascular⁸⁴. En ausencia de tratamiento pueden sufrir un evento cardiovascular antes de los 30 años de edad, produciéndose la muerte en aproximadamente el 50% de los individuos afectos^{85,86,87}.

En los últimos años, la homocisteína plasmática ha adquirido un gran interés clínico, ya que, aunque existe mucha controversia, el aumento moderado de homocisteína plasmática, se ha considerado un factor de riesgo vascular coronario, cerebral o periférico independiente de otros factores trombogénicos convencionales^{86,88,89,90}.

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo fácilmente modificable con un tratamiento, seguro y eficaz, de ácido fólico y vitaminas B₁₂ y B₆ asociados⁹¹. El tratamiento con ácido fólico reduce significativamente los niveles de homocisteína.

Aunque todavía no existe suficiente evidencia científica, algunos autores defienden que la intervención (tratamiento con ácido fólico y vitamina B6), reduce la progresión de la aterosclerosis⁹².

Las repercusiones clínicas de la hiperhomocisteinemia, la importancia y dependencia de vitaminas en su metabolismo, así como las implicaciones genéticas de sus enzimas hacen que la medición de la concentración de tHcy plasmática se incluya en el estudio de aquellos pacientes que han sufrido un evento cardiovascular.

1.2.2 Factores de riesgo vascular "no modificables"

➤ Edad

La incidencia de enfermedad vascular aumenta con la edad, con independencia del sexo y raza. Se considera factor de riesgo vascular ser varón mayor de 45 años y mujer mayor de 55 años⁹³. La incidencia de ictus aumenta exponencialmente con la edad, incrementándose un 10% por año⁹⁴.

➤ Sexo

Para un mismo valor de colesterol total, el riesgo de cardiopatía isquémica es aproximadamente 4 veces superior en varones que en mujeres, aumentando con la menopausia sin llegar a alcanzar el riesgo de los varones⁹⁴.

➤ Marcadores Genéticos

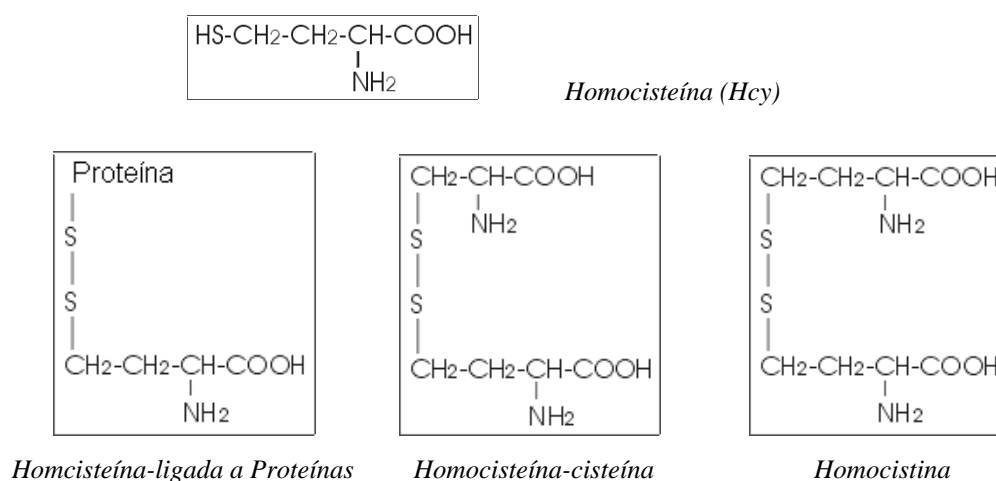
Dado el carácter multifactorial de la enfermedad cardiovascular, se han estudiado aquellos genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de aterotrombosis como son el metabolismo lipídico, cascada de la coagulación, apolipoproteína E⁹⁵.

1.3 HOMOCISTEÍNA

En 1922 Mueller⁹⁶ descubre un nuevo aminoácido azufrado. En 1928, se conoce la estructura de la metionina⁹⁷ y en 1932 Butz y DuVigneaud⁹⁸ descubren un homólogo de cisteína (la homocisteína), tratando con ácido sulfúrico la metionina. En 1952, DuVigneaud⁹⁹ establece el papel de la homocisteína y su transmetilación en el metabolismo de la metionina, demostrando que la homocisteína se convierte en cistationina a través de la vía de la transulfuración y que es intermediario en la conversión de metionina a cisteína, así como en la remetilación de homocisteína a metionina.

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido no proteico (α -amino, γ -tiolbutírico) intermediario en el metabolismo de aminoácidos sulfurados. Se sintetiza como producto intermedio en el metabolismo de metionina hasta cisteína.

En sangre, la homocisteína circula en diferentes formas moleculares, tales como homocisteína libre reducida (Hcy), homocistina, dímeros, y unida a proteínas. Aproximadamente el 70-80% de la homocisteína plasmática se encuentra unida a proteínas, fundamentalmente albúmina, mediante puentes disulfuro. El 30% restante se encuentra formando dímeros de homocisteína-cisteína, homocisteína-homocisteína (homocistina), y monómeros de homocisteína no unida a proteínas¹⁰⁰.



La suma de todas las formas moleculares, se denomina homocisteína total (tHcy), y su medición es la que resulta de interés diagnóstico y clínico, ya que la concentración circulante del monómero homocisteína, es variable y depende de numerosas situaciones fisiológicas.

Recientemente se ha descubierto en muestras biológicas la presencia de metabolitos de Hcy, como la homocisteína-tiolactona^{101,102,103} y las denominadas proteínas “homocisteinadas” unidas a Hcy por el N-terminal (N-Hcy-proteína)¹⁰⁴. La homocisteína-tiolactona plasmática representa el 0,3% de la tHcy, mientras que en orina representa el 28% de la Hcy. Las N-Hcy-proteínas constituyen el mayor reservorio de homocisteína en sangre, con un 75% de N-Hcy-Hemoglobina y un 22% de N-Hcy-albúmina¹⁰⁵.

1.3.1 Metabolismo de la homocisteína

La síntesis de homocisteína a partir de metionina y su metabolismo se resume en la figura 1.3.1-1. La metionina procedente de la dieta o del catabolismo de proteínas endógenas, en presencia de ATP, se convierte en S-adenosilmetionina (adoMet o SAM) por acción de la enzima L-metionina adenosiltransferasa.

La SAM interviene generalmente en el transporte de grupos monocarbonados, especialmente de grupos metilo. La S-adenosilmetionina aporta grupos metilos para la síntesis de colina, creatina, adrenalina, melatonina, sarcosina y metilación de ADN y ARN.

La transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a un aceptor (R), da lugar a la formación de S-adenosilhomocisteína, que es hidrolizada por la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa, dando lugar a homocisteína y adenosina, siendo ésta la única vía de obtener homocisteína en vertebrados.

A partir de la homocisteína, el metabolismo se bifurca en dos rutas metabólicas diferentes: 1) la vía de la transulfuración y 2) la vía de la remetilación.

➤ *Vía de la transulfuración*

En una primera etapa la homocisteína se une a una molécula de serina transformándose en cistationina, mediante la acción de la cistationina-β sintasa (CBS), en una reacción dependiente de B6. Esta reacción es irreversible en condiciones fisiológicas. Posteriormente la cistationina se transforma en cisteína por la acción de la cistationina γ-liasa, dependiente de B6, dando lugar a la formación de α-oxobutirato.

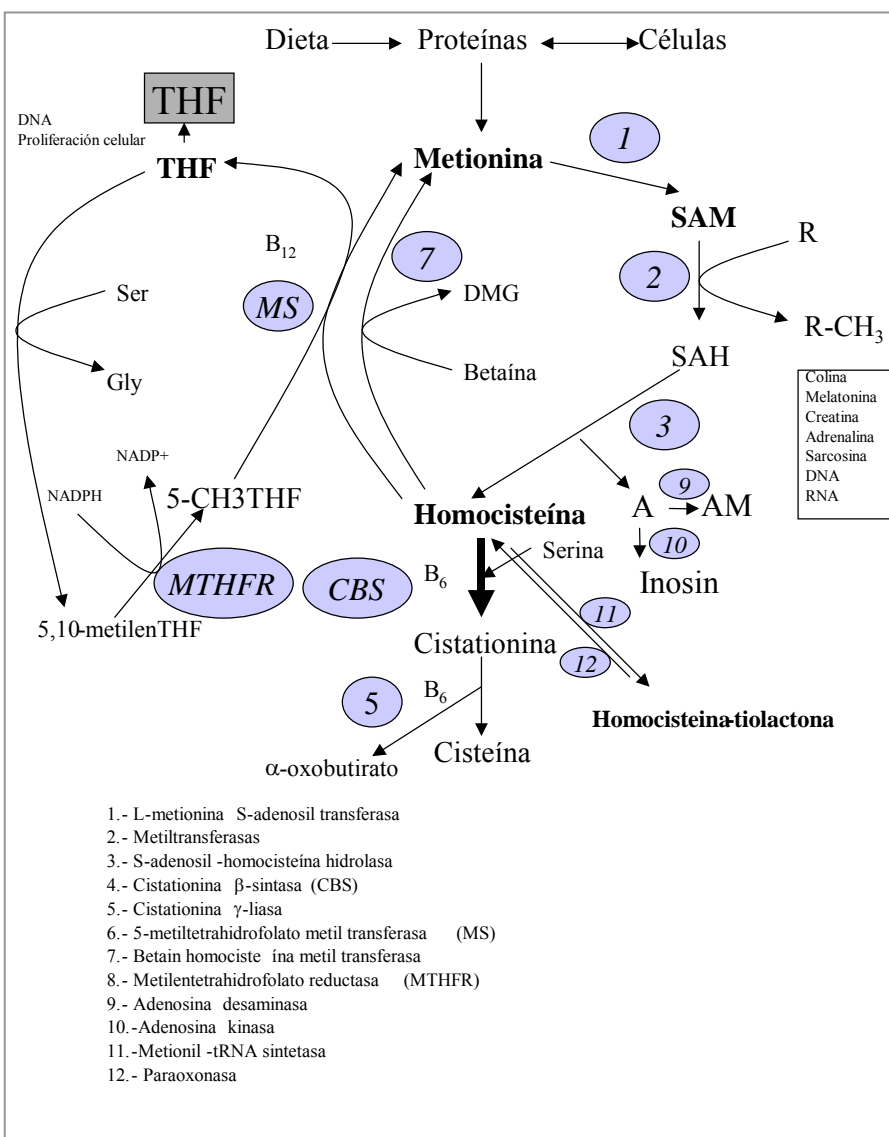


Figura 1.3.1-1. Metabolismo de la Homocisteína

➤ *Vía de la remetilación*

En esta vía, la metionina se regenera desde homocisteína a través de dos rutas metabólicas independientes en las que participan las enzimas metionina sintasa (MS ó 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransfera) y la betaína-homocisteína metiltransferasa. La primera de estas enzimas (MS) requiere como dador de grupos metilo la 5-metiltetrahidrofolato y como cofactor metilcobalamina. La segunda enzima (betaína-homocisteína metiltransferasa), se encuentra en hígado, riñón y glándulas suprarrenales y necesita betaína como fuente de grupos metilo.

La acción de ambas enzimas permite mantener un equilibrio entre metionina y S-adenosilmetionina. En humanos, aproximadamente el 50% de la homocisteína se convierte en metionina por esta vía de remetilación¹⁰⁶. El tetrahidrofolato desmetilado por la acción de la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa, entra en el depósito intracelular de folatos reducidos. Si la velocidad de esta reacción se reduce, podría quedar secuestrado el folato en forma de 5-metiltetrahidrofolato, disminuyendo la disponibilidad de tetrahidrofolato para la síntesis de ADN y la proliferación celular, efecto conocido como trampa del folato¹⁰⁷.

La concentración plasmática de metionina determina la ruta (transulfuración ó remetilación) que seguirá la homocisteína, tal y como se recoge en la figura 1.3.1-2. Así cuando la metionina aumenta, se ponen en marcha dos mecanismos de adaptación que estimulan la transulfuración. Como consecuencia del aumento de SAM, se produce un aumento de actividad de la CBS, aumentando el flujo de transulfuración y una disminución de la MTHFR, disminuyendo a su vez, la tasa de remetilación hepática de la homocisteína. Así, a corto plazo se produce un aumento de cistationina y un descenso de la síntesis de 5-CH₃THF. A largo plazo se produce una disminución de la síntesis de las enzimas implicadas en la remetilación y un aumento de CBS.

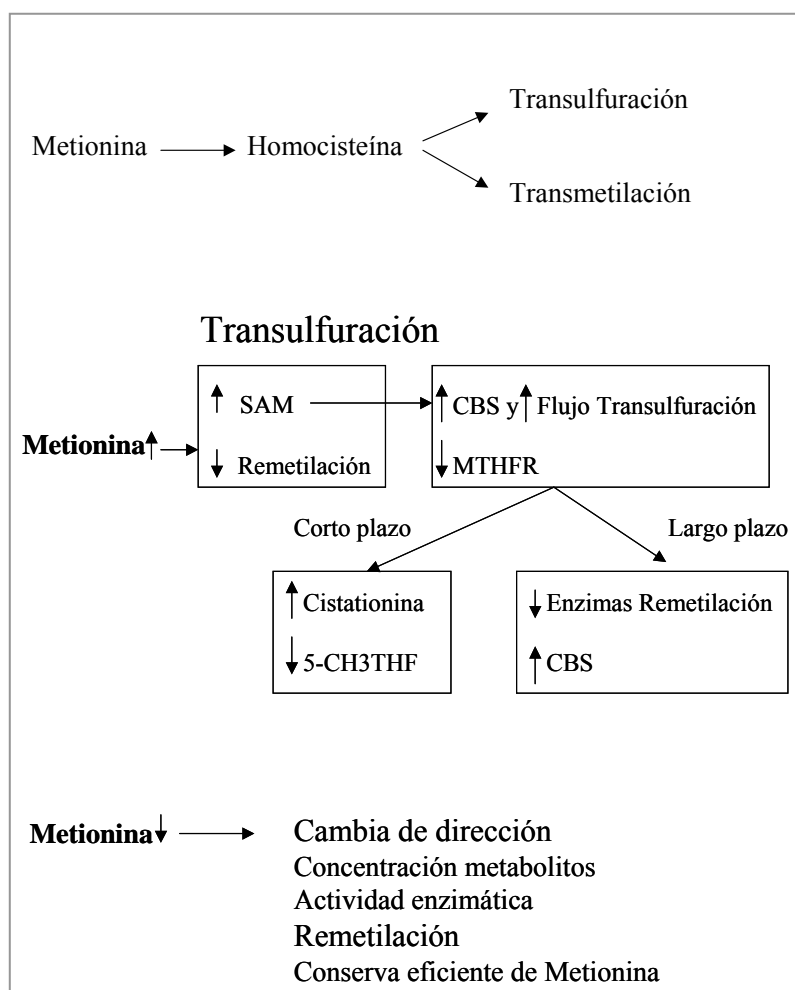


Figura 1.3.1-2. Vías de transulfuración ó trasnsmetilación, dependiendo de metionina

Cuando disminuye la concentración plasmática de metionina, el metabolismo de homocisteína cambia de sentido, así como la actividad de las enzimas implicadas, aumentando la remetilación, asegurándose de esta manera la conservación de los niveles de metionina.

La síntesis endógena de metionina y de S-adenosilmetionina se regula por las necesidades metabólicas celulares, lo que permite mantener la concentración de homocisteína en niveles no tóxicos. La concentración intracelular de homocisteína alcanza valores muy bajos. Cuando aumenta su síntesis ó disminuye su catabolismo, aumenta su exportación al espacio extracelular, por lo que los niveles de homocisteína

plasmática, reflejan la actividad enzimática, así como la disponibilidad de sustratos y cofactores. La vida media de la homocisteína oscila entre 12 y 24 horas.

1.3.2 Causas de hiperhomocisteinemia (HHcy).

El aumento moderado de la concentración de homocisteína plasmática total o hiperhomocisteinemia (HHcy), se produce fundamentalmente por la disminución de la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo, debido a alteraciones en su estructura primaria (defectos hereditarios), defectos de sus coenzimas (metilcobalamina y vitamina B6), ó bien defectos de sustrato (metiltetrahidrofolato).

El intervalo de referencia para los niveles de tHcy oscila entre 8 y 15 $\mu\text{mol/L}$, por encima del cual, se considera situación de hiperhomocisteinemia. De acuerdo a los niveles plasmáticos, la hiperhomocisteinemia se clasifica como¹⁰⁰: a) **moderada** cuando existe $[\text{tHcy}]=15\text{-}30\text{ }\mu\text{mol/L}$, b) **intermedia** si $[\text{tHcy}]=30\text{-}100\text{ }\mu\text{mol/L}$ y c) **severa** si $[\text{tHcy}]\geq 100\text{ }\mu\text{mol/L}$. Sin embargo una hiperhomocisteinemia, por sí sola, no revela el origen del defecto metabólico. Las causas de hiperhomocisteinemia son múltiples y están interrelacionadas^{108,109}. Fundamentalmente se pueden agrupar en *fisiológicas, hereditarias^{110,111} y adquiridas^{112,113}*.

➤ Las causas *fisiológicas* más importantes son la edad y el sexo. Está descrito que los niveles de tHcy aumentan con la edad en ambos sexos, debido en parte a la disminución fisiológica de la función renal, así como a deficiencias vitamínicas, consecuencia de una menor absorción intestinal. Ya en la edad pediátrica se observan diferencias significativas entre niños menores y mayores de 10 años¹¹⁴. Sin embargo se ha descrito que en población mayor de 90 años, los niveles de tHcy disminuyen, habiéndose asociado la supervivencia con niveles bajos de tHcy¹¹⁵.

Con respecto al sexo, las mujeres presentan valores menores que los hombres hasta la edad de la menopausia, momento en el que los niveles de tHcy se igualan en ambos sexos¹¹⁶, habiéndose descrito una correlación inversa entre niveles de estradiol y tHcy¹¹⁷. Durante la gestación se produce una disminución de los niveles de tHcy, debido en parte a la situación hormonal, así como por efecto de

hemodilución. Otro factor a considerar, es la diferencia en la masa muscular ya que la síntesis de creatina-creatinina, requiere S-adenosilmetionina, generándose homocisteína en dicha reacción enzimática¹⁰⁰, aumentando los niveles de homocisteína.

- Las causas *hereditarias* más frecuentes son las originadas por mutaciones en los genes que codifican las enzimas: Cistationina β -sintasa (CBS), 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa [metionina sintasa (MS)], y Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La deficiencia de estas enzimas causa una hiperhomocisteinemia más o menos severa, que puede ir acompañada de aciduria metilmalónica (AMM) en algunos defectos de cobalamina¹¹⁸ (CblC, CblD y CblF).

- Cistationina β -sintasa, CBS (EC 4.2.1.22)

Monómero de 551 aminoácidos¹¹⁹. La forma enzimática que predomina es un tetramero al que se une un fosfato de piridoxal como cofactor. Esta enzima une dos sustratos: los aminoácidos serina y homocisteína y tres ligandos: fosfato de piridoxal, S-adenosilmetionina y un grupo hemo, permitiendo este último el correcto plegamiento del polipéptido formando una hemoproteína requerida para la unión de fosfato de piridoxal. En condiciones fisiológicas, el equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la síntesis de cistationina (Fig 1.3.1-1), y permite la eliminación de compuestos azufrados del ciclo¹²⁰.

El gen que codifica esta enzima se localiza en la región subtelomérica del cromosoma 21, 21q22.3. Se han identificado al menos 20 mutaciones del gen que codifica la enzima¹²⁰. La heterogeneidad de la enfermedad se evidencia por la actividad residual de la enzima. La mayor parte de las mutaciones se encuentran entre los exones 2 y 12. Las mutaciones descritas como más prevalentes en pacientes con homocistinuria son: 833T>C y 919G>A.

La deficiencia enzimática se hereda de forma autosómica recesiva y la incidencia, aunque varía según la población estudiada, oscila entre 1:60.000-

340.000⁸³. Los pacientes homocigotos para la mutación, presentan la forma más severa de la enfermedad denominada homocistinuria clásica que cursa con niveles de homocisteína muy elevados ($>100\mu\text{mol/L}$).

En pacientes heterocigotos se observa un aumento moderado de los niveles de homocisteína. Se estima que entre el 0,2-2 % de la población general es heterocigoto para esta deficiencia^{83,121}. La gravedad de la enfermedad está en relación con los niveles de homocisteína plasmática total.

- 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa (metionina sintasa)(EC 2.1.1.13)

Enzima citoplasmática que cataliza la transferencia del grupo metilo desde el 5-metiltetrahidrofolato¹²², a la homocisteína para formar metionina, regenerando el ácido tetrahidrofólico para nuevo transporte de grupos formilo, metilo y metileno necesarios en la síntesis de purinas y pirimidinas. El grupo metilo se transfiere a cobalamina I (metilcobalamina) y a la homocisteína. Esta se transforma en metionina regenerando la cobalamina I para entrar en un nuevo ciclo. La cobalamina I unida a la enzima, participa en un determinado número de ciclos para luego oxidarse a cobalamina II y III. Su regeneración a cobalamina I requiere de un sistema reductor y de S-adenosilmetionina. Las alteraciones nutricionales ó genéticas involucradas en la formación de metilcobalamina¹²³ y de metiltetrahidrofolato¹²⁴, inducen deficiencia enzimática funcional. La enzima se encuentra fundamentalmente en corazón, páncreas, músculo esquelético y placenta y en menor proporción en hígado, pulmón, cerebro y riñón.

El gen que codifica esta enzima se localiza en el cromosoma 1, 1q42.3-43¹²⁵.

- *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (EC 1.5.1.20)*

La deficiencia se hereda de forma autosómica recesiva y el gen que codifica esta enzima se localiza en el cromosoma 1, en la región 1p36.3^{126,127} y codifica para una proteína de 656 aminoácidos, homodímero de peso molecular 150KD. Se trata de una flavoproteína citoplasmática, que requiere NADPH como dador de electrones, siendo responsable junto a la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa, del suministro de átomos de carbono para las reacciones de metilación, en las que el SAM es el dador universal. Cataliza la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato.

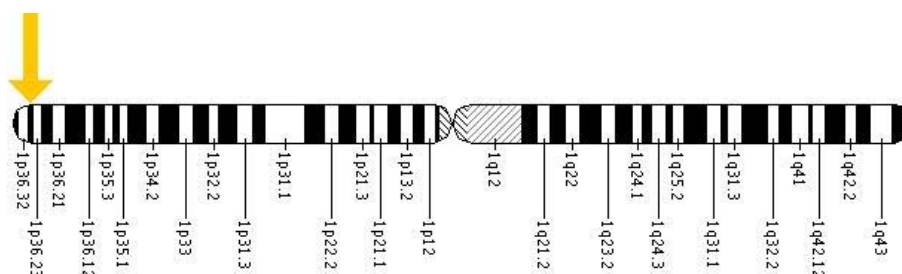


Figura 1.3.2-1. Cromosoma 1. Locus del gen que codifica la MTHFR

En condiciones fisiológicas esta reacción es irreversible (figura 1.3.1-1). La deficiencia hereditaria de esta enzima es causa de homocistinuria aunque menos severa que la debida a la CBS. Se han descrito al menos 14 mutaciones severas en este gen^{126,128,129}. El pronóstico de estas enfermedades dependerá de la actividad residual enzimática.

Esta enzima presenta además, una variante con sensibilidad térmica¹³⁰, diferente de la enzima que se presenta en pacientes con deficiencia severa¹³¹. Esta variante termosensible se debe a la presencia del polimorfismo 677C>T, el cual sustituye citosina por timina, lo que origina el cambio de alanina por valina en la posición 222 de la proteína. Este polimorfismo, identificado por Frosst en 1995, se presenta con una elevada frecuencia entre la población general¹³², habiéndose encontrado variación geográfica y étnica en la distribución del alelo T y genotipo

TT¹³³. La actividad enzimática disminuida (<30%) de la variante termolábil, da lugar a hiperhomocisteinemia.

- Entre las causas ***adquiridas***, se pueden citar: 1) estilo de vida, 2) situación clínica y 3) tratamiento farmacológico.

1) Los niveles de tHcy se modifican con el estilo de vida. Uno de los factores determinantes de hiperhomocisteinemia es el tipo de dieta y la ingesta mayor o menor de vitaminas^{108,134}, habiéndose demostrado en situación de hiperhomocisteinemia moderada una asociación inversa entre los niveles de tHcy y folato plasmático y vitamina B₁₂, mientras que los resultados son contradictorios para la vitamina B₆. Así mismo, se ha observado que la suplementación vitamínica con fólico y B₁₂ disminuye la elevación de Hcy, mientras que no es así para la vitamina B₆¹³⁵. En estudios realizados en pacientes con aterosclerosis, se demuestra que la administración de folato y vitaminas, disminuye los niveles de colesterol, LDL, apoB, triglicéridos y homocisteína¹³⁶. En determinadas zonas geográficas, con dietas pobres en ácido fólico, se ha demostrado la existencia de enfermedad coronaria elevada¹³⁷. El descenso en la mortalidad por enfermedad cardiovascular que se ha producido en Estados Unidos desde 1963, se puede explicar en parte por la fortificación con piridoxina y suplementos vitamínicos de cereales para consumo¹³⁸. Otros factores como el tabaquismo, la falta de ejercicio, consumo elevado de alcohol y de café aumentan moderadamente la concentración de Hcy^{139, 140,141}, especialmente en situación de bajo consumo de ácido fólico.

La adopción de una dieta vegetariana como estilo de vida saludable ha demostrado elevación de tHcy en individuos adultos¹⁴² y en mujeres postmenopausicas¹⁴³, en relación con individuos sanos omnívoros en la misma situación, lo que no se demuestra en niños vegetarianos¹⁴⁴, cuya dieta aporta suficientes niveles de B₁₂.

2) Son causa de hiperhomocisteinemia determinadas situaciones clínicas como la deficiencia de vitaminas B (folato, B₁₂, B₆ y riboflavina)¹³⁴, situaciones de

malnutrición como ocurre en la anorexia nerviosa¹⁴⁵, individuos vegetarianos^{142,143}, situaciones de malabsorción como ocurre en enfermedades gastrointestinales¹⁴⁶, situaciones de fallo renal^{147,148} e hipotiroidismo¹⁴⁹.

- 3) Algunos fármacos inhibidores de la dihidrofolato reductasa que interfieren con el metabolismo y absorción de folatos y vitaminas, pueden causar hiperhomocisteinemia. Así, el *metotrexate*TM y el *trimetropin*TM producen una depleción celular de folato reducido. El tratamiento con altas dosis de *metotrexate* causa un aumento de homocisteína, que se normaliza con la administración de folato¹⁵⁰. Fármacos antiepilépticos como fenitoína o carbamacepina, poseen acción antifolato y aumentan la tasa metabólica de folatos¹⁵¹. Otros fármacos antagonistas de vitaminas, anticonceptivos y tratamiento hormonal, modifican el estado vitamínico¹¹³.

1.3.3 Hiperhomocisteinemia como factor de riesgo vascular

En 1969, McCully¹⁵² relaciona por primera vez **enfermedad vascular** e **hiperhomocisteinemia** en pacientes con homocistinuria clásica por deficiencia severa de cistationina-β sintasa (*CBS*), así como en pacientes con deficiencia parcial de *CBS*. Basados en esta observación, a finales de los años 90 se desarrolla la teoría que relaciona hiperhomocisteinemia y enfermedad cardiovascular^{138,153,154}. La primera evidencia que soporta la teoría de hiperhomocisteinemia y aterosclerosis se obtuvo con la producción de arteriosclerosis y trombosis en conejos alimentados con homocisteína¹⁵⁵. Wilcken y Wilcken publican en 1976 la primera evidencia directa en humanos de la teoría homocisteína-aterosclerosis, demostrando el aumento de los niveles elevados de homocisteína y homocisteína-cisteína en pacientes con enfermedad coronaria tras la toma oral de metionina¹⁵⁶. La relación observada, así como el interés en la búsqueda de nuevos factores de riesgo vascular independientes, capaces de explicar un evento cardiovascular en ausencia de factores de riesgo clásicos (hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, etc), llevó en los años 80 a la realización de

numerosos estudios clínicos y epidemiológicos con el objetivo de demostrar la teoría de McCully¹⁵².

Un metaanálisis realizado en 1995 concluye que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo vascular independiente para aterosclerosis¹⁵⁷. Diversos estudios epidemiológicos^{158,159,160,161} demuestran la asociación entre niveles plasmáticos de homocisteína y riesgo cardiovascular^{89,162,163}, siendo éste 1,5 a 2 veces mayor en sujetos con hiperhomocisteinemia moderada, mientras que otros estudios no han podido confirmar esta asociación^{164,165}.

En el momento actual existen un gran número de estudios epidemiológicos y metaanálisis^{86,121,158,166}, en los que se demuestra que la hiperhomocisteinemia moderada es un factor de riesgo independiente de aterosclerosis y trombosis. La hiperhomocisteinemia moderada se ha relacionado con patología vascular cardíaca¹⁶⁷, cerebral y periférica^{168,169,170}, hipertensión arterial^{148,171}, aumento de la mortalidad en infarto de miocardio, desarrollo de insuficiencia cardíaca¹⁷², incremento del riesgo de nuevos eventos cardiovasculares en pacientes que han sufrido un síndrome coronario agudo^{173,174,175}. La presencia de hiperhomocisteinemia (tHcy>12 µmol/L) predice de forma independiente la progresión de la placa coronaria¹⁷⁶. Así mismo se ha demostrado asociación entre hiperhomocisteinemia y aumento de la masa del ventrículo izquierdo, especialmente en mujeres¹⁷⁷.

En pacientes con accidentes isquémicos transitorios, la hiperhomocisteinemia parece tener la misma prevalencia que en el infarto cerebral¹⁷⁸.

La tHcy plasmática elevada, se ha asociado con fenotipos intermedios de enfermedad vascular cerebral como infartos silentes¹⁷⁹, estenosis carotídea asintomática¹⁸⁰, así como con el grosor de la íntima media carotídea¹⁸¹. Se ha demostrado también que la tHcy plasmática determinada durante la fase aguda o crónica del ictus, es un factor de riesgo independiente de recurrencia vascular y cerebrovascular durante los dos primeros años¹⁸².

La prevalencia de hiperhomocisteinemia en pacientes con ictus, es del 20-30%^{158,183}. El riesgo de hemorragia cerebral es 2 veces superior en pacientes con niveles moderadamente elevados de tHcy¹⁸⁴.

Estos hallazgos justifican plenamente la evaluación mediante ensayos clínicos de la corrección de la hiperhomocisteinemia como medida de prevención secundaria del ictus isquémico.

El tratamiento con vitaminas reduce de manera considerable los niveles plasmáticos de tHcy, siendo efectivo en la reducción de episodios vasculares en pacientes con homocistinuria¹⁸⁵. Diversos estudios prospectivos^{186,187}, demuestran que la reducción de los niveles de tHcy podría alterar de forma favorable los eventos cardiovasculares. La suplementación con ácido fólico previene la disfunción endotelial en sujetos con niveles de tHcy normales y la mejora en pacientes con HHcy, ECV o sujetos con factores de riesgo vascular¹⁸⁸.

La eficacia de la aportación de suplementos vitamínicos (ácido fólico, vitamina B₁₂ y B₆) en la reducción de eventos vasculares está siendo evaluada con la puesta en marcha de diversos estudios de intervención multinacionales aleatorizados (*Vitamin Intervention for Stroke Prevention*, VISP, VITATOPS, NORVIT)¹⁸⁹. En un primer análisis de los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias entre pacientes con enfermedad vascular ó diabéticos¹⁹⁰, accidente vascular cerebral, tratados o no con vitaminas¹⁹¹, ni beneficio en pacientes que han superado un infarto de miocardio¹⁹². Algunos de estos estudios pueden presentar menor significación de la esperada debido a la coincidencia en el tiempo con la fortificación obligatoria en EEUU y Canada de harinas y cereales con folatos.

1.3.4 Mecanismos de acción de la homocisteína

Aunque existe evidencia de asociación entre homocisteína plasmática y morbi-mortalidad cardiovascular, los mecanismos a través de los cuales la Hcy ejerce el daño vascular no están bien definidos, habiéndolo sido propuestos algunos mecanismos patofisiológicos como potenciales causantes de aterogénesis y trombogénesis¹⁹³. Se ha

demostrado una relación causal entre homocisteína y aterosclerosis en ratones deficientes de apo-E. Aunque se han propuesto algunos mecanismos de estrés celular como estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico e inflamación, su asociación con la aterosclerosis no está clara. Marcadores del estrés del retículo endoplásmico (GRP78/94 y fosfo-PERK), marcadores de estrés oxidativo (Hsp70) y marcadores de inflamación (fosfo-IkappaB- α) se encontraron elevados, en condiciones de dieta con altas dosis de metionina. Por tanto parece que se involucran múltiples vías en la aterosclerosis¹⁹⁴.

Probablemente, la toxicidad endotelial, la oxidación de las LDL y los efectos protrombóticos de la Hcy son algunos de los mecanismos implicados en esta relación. El aumento del estrés oxidativo causado por la Hcy podría contribuir a la disfunción endotelial y fibrosis miocárdica. Sin embargo, son necesarios un mayor número de estudios experimentales y clínicos para confirmar esta relación, así como para estudiar el efecto de las intervenciones dirigidas a la disminución de la concentración de Hcy, antes de poder emitir recomendaciones sobre el uso clínico de la determinación de Hcy. Aunque inciertos son varios los mecanismos propuestos. Como se ha descrito en capítulos anteriores, la disfunción endotelial y el daño vascular son los causantes de desarrollo de aterosclerosis y trombosis⁸³. *In vivo* la hiperhomocisteinemia produce rápidamente daño de la función endotelial. Además, *in vitro* la hiperhomocisteinemia produce efectos deletéreos no solo en células endoteliales, sino en plaquetas, células vasculares de músculo liso, en la coagulación y en procesos de inflamación^{195,196}.

La hiperhomocisteinemia puede ejercer su efecto reduciendo la disponibilidad de óxido nítrico y por efecto directo promitogénico en las células vasculares de músculo liso^{86,197}.

➤ *S-adenosilhomocisteína (SAH). Modulación del metabolismo de Adenosina*

Estudios recientes sugieren que no solo la homocisteína sino su metabolito precursor, la S-adenosilhomocisteína (SAH o AdoHcy), podría ser también responsable de los adversos efectos cardiovasculares de la hiperhomocisteinemia, siendo un marcador más sensible que la tHcy¹⁹⁸. Se ha descrito la sinergia que se produce entre SAH y tHcy dañando el ADN celular, probablemente a través de un mecanismo que implica las ROS y provoca la hipometilación del ADN¹⁹⁹.

En condiciones fisiológicas, la adenosina es producida de manera continua por diversos tipos celulares, tales como células endoteliales, musculares lisas, originando principalmente hidrólisis extra e intracelular de adenosin mono fosfato (AMP) por la actividad de 5'-nucleotidasa. En una segunda vía, la adenosina se libera de forma continua por la acción de la S-adenosilhomocistein hidrolasa sobre SAH para dar lugar a Hcy. En condiciones de hipoxia, la hidrólisis de AMP aumenta, siendo esta vía de síntesis de adenosina mayoritaria. La adenosina extracelular entra en la célula mediante transportadores y es degradada a inosina por la acción de la adenosín deaminasa (ADA), o refosforilada a AMP por adenosina kinasa. La adenosina intracelular es transportada mediante receptores de membrana de adenosina al espacio extracelular. Cuando se produce un aumento intracelular de homocisteína, la reacción reversible catalizada por S-adenosilhomocisteína hidrolasa, cambia de sentido produciéndose un aumento de S-adenosilhomocisteína (SAH ó AdoHcy) a expensas de adenosina endógena. La SAH se une a metiltransferasas con una afinidad mayor que la S-adenosilmetionina (SAM ó AdoMet) y es un potente inhibidor de la mayoría de reacciones de metilación, actuando la SAH como inhibidor de la remetilación de homocisteína a metionina, ya que es un potente inhibidor de metiltransferasas, en equilibrio con la Hcy²⁰⁰. Esta disminución de adenosina intracelular podría contribuir al aumento de riesgo vascular. Como consecuencia se produce la estimulación del receptor de adenosina para aumentar la captación extracelular de adenosina al interior de la célula.

La adenosina endógena se libera en respuesta a una gran variedad de situaciones de estrés y daño celular, para de una forma autocrina, ejercer un papel protector²⁰¹. Así la adenosina ejerce en el corazón efectos negativos directos inotrópicos, dromotrópicos y

cronotrópicos²⁰², e incrementa la tolerancia a la isquemia- reperusión, en un fenómeno denominado²⁰³ “precondicionamiento isquémico”. En relación con el tono vascular, la adenosina es un potente vasodilatador, ejerciendo su acción de dos maneras; 1) directamente estimulando el endotelio y las células musculares lisas del vaso y 2) indirectamente bloqueando la síntesis de vasoconstrictores como la angiotensina II, inhibiendo la liberación de renina²⁰⁴. A nivel de estructura celular, la adenosina inhibe la liberación de norepinefrina presináptica y reduce la respuesta vasoconstrictora postsináptica en respuesta a la estimulación de α -adrenoreceptor²⁰⁵. La estimulación del receptor de adenosina inhibe la agregación de trombocitos, la expresión de P-selectina y del factor de necrosis tumoral, y previene la formación de tromboembolia²⁰⁶. Así mismo la adenosina es un potente antiinflamatorio. Disminuye la expresión de moléculas de adhesión endotelial, suprime la generación de superóxido por estimulación de neutrófilos y modula la producción de citoquinas²⁰¹. La estimulación del receptor de adenosina regula la proliferación celular vascular, el cual juega un papel clave en el proceso de remodelación celular que en ultima instancia da lugar al fallo cardíaco²⁰⁷.

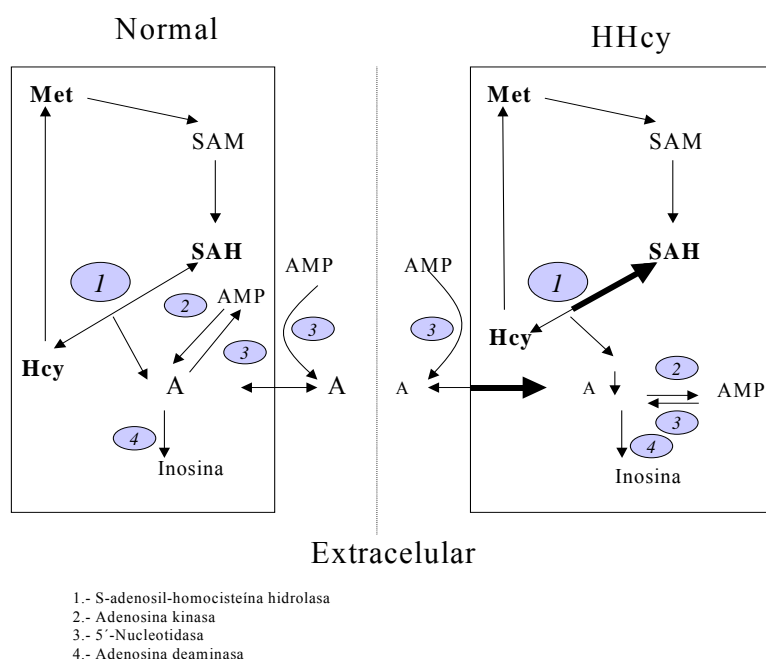


Figura 1.3.4-1 . Mecanismo de S-Adenosilmetionina y Adenosina (SAH ó AdoHcy y A)

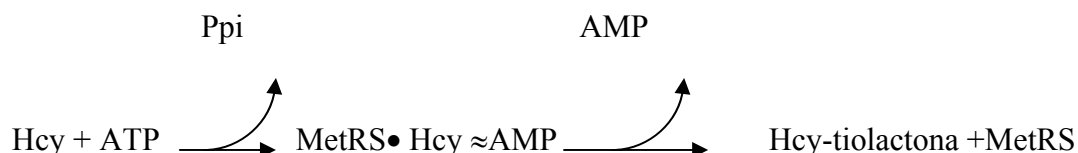
En situación de hiperhomocisteinemia, la concentración de adenosina intracelular disminuye. La mayoría de efectos adversos de la hiperhomocisteinemia, como el daño vascular, disfunción endotelial, proliferación de células musculares lisas, aumento de la síntesis de colágeno, activación plaquetaria, trombogénesis e inflamación se ajustan a lo esperado en situación de daño de la estimulación del receptor de adenosina.

Recientemente se ha demostrado en eritrocitos aislados, que la hiperhomocisteinemia acelera significativamente la captación intracelular de adenosina, asociado a un incremento intracelular de SAH, que se inhibe por bloqueo del receptor transportador²⁰⁸. Por tanto, algunos estudios realizados en hiperhomocisteinemia experimental, así como uno realizado en pacientes con homocistinuria, han demostrado evidencia de que en situación de hiperhomocisteinemia, se acelera la captación celular de adenosina, debido al incremento intracelular de la síntesis de SAH. Este efecto es más pronunciado en situaciones de mayor concentración extracelular de adenosina, tal como inflamación, hipoxia o isquemia, que limitan la estimulación del receptor de adenosina, con el objeto de proteger el tejido dañado²⁰⁸.

El incremento de S-adenosilhomocisteína en situación de hiperhomocisteinemia, y su papel como inhibidor en reacciones de metilación, podría dar lugar a una hipometilación del ADN. Se ha podido demostrar la existencia de una correlación inversa entre el estatus de metilación de ADN en leucocitos y los niveles plasmáticos de homocisteína en individuos sanos^{209,210}. Por el contrario, en pacientes alcohólicos, se produce una asociación entre los niveles elevados de homocisteína y el incremento de la metilación del ADN²¹¹.

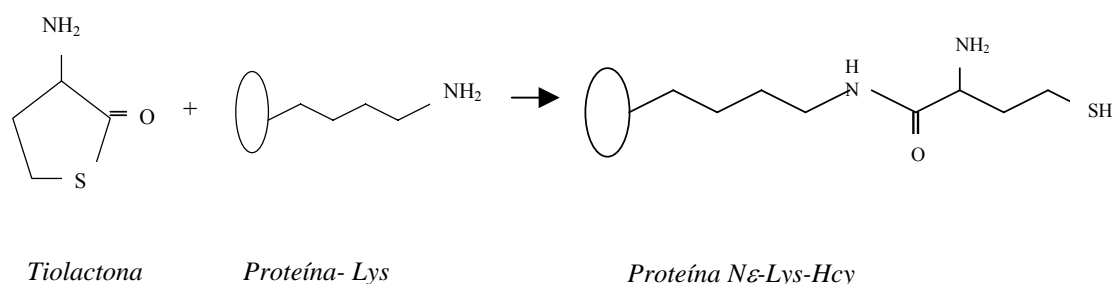
➤ *Homocisteína-tiolactona. Proteínas Nε-Lys-Hcy*

La conversión de homocisteína en homocisteína-tiolactona se realiza por la acción de la metionil-tRNA sintetasa, según la reacción siguiente, considerada una vía tóxica en humanos.



La homocisteína-tiolactona (Hcy-tiolactona) descubierta en 1934 por Baernstein, es un metabolito altamente reactivo y tóxico¹⁰³, capaz de reaccionar muy fácilmente con aminas primarias de proteínas, especialmente con residuos de lisina (Lys), produciendo aductos N-Hcy-proteínas, de forma que el grupo carboxilo de la Hcy se une a través del N del grupo ε-amino de residuos de lisina¹⁰⁴.

La homocisteína-tiolactona, puede reaccionar con residuos de lisina de numerosas proteínas celulares, alterando su actividad biológica y la degradación prematura de proteínas²¹².



El acúmulo de Hcy-tiolactona produce daño celular, habiéndose propuesto el mecanismo de “homocisteinilación” de las proteínas como uno de los posibles mecanismos, subyacentes a las consecuencias patológicas que se derivan de un desequilibrio en el metabolismo de la homocisteína.

Recientemente se ha propuesto²¹³ que las proteínas Nε-Lys-Hcy se comportan como nuevos auto-antígenos, y el aumento de proteínas Nε-Hcy-Lys provoca una respuesta autoinmune. Los auto-anticuerpos que reconocen los epítomos de estas proteínas, podrían reaccionar en numerosos tejidos, eliminándolos de la circulación, lo que podría tener un resultado beneficioso. Se ha demostrado que los niveles de anticuerpos anti-proteínas Nε-Lys-Hcy, correlacionan directamente con los niveles de Hcy, pero no con los de cisteína ó metionina.

Se especula que si en el proceso de la aterosclerosis, estas proteínas estuvieran presentes en las células endoteliales, podría dar lugar a la formación del complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del vaso²¹⁴, recubriendo las células endoteliales, lo que podría dar lugar a su fagocitación por macrófagos, con resultado final de daño vascular.

➤ *Oxido Nítrico (NO) y Dimetilarginina asimétrica (ADMA)*

El óxido nítrico se sintetiza en el endotelio vascular a partir del aminoácido L-arginina, por la acción de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y contribuye a la regulación del tono vascular. El NO está implicado en una gran variedad de mecanismos de regulación del sistema cardiovascular, por lo que la vía endotelial L-arginina /óxido nítrico se considera el mayor efector del control endotelial de la homeostasis vascular. El NO, además de ser un factor de relación de células de músculo liso, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria en el endotelio vascular y la migración celular, limita la oxidación de las LDL aterogénicas. El NO podría modular la concentración de Hcy inhibiendo directamente la metionina sintasa²¹⁵ o de forma indirecta inhibiendo la síntesis de ferritina²¹⁶, modificando el catabolismo de folatos.

La presencia del polimorfismo 894G>T en el gen que codifica la eNOS, podría estar relacionado con la severidad de la enfermedad cardiovascular, lo que llevaría a un producción alterada de NO que en combinación con la presencia de hipehomocisteinemia podría dar lugar a una disminución de la captura de Hcy en S-nitrosohomocisteína, con la subsecuente exposición del sistema homeostático a los efectos tóxicos de Hcy²¹⁷.

Otro polimorfismo resultante del cambio de timina por citosina en el nucleótido -786 T>C del promotor del gen de la óxido nítrico sintasa (eNOS), responsable de la reducción de actividad del gen, se ha asociado con la enfermedad aterogénica, de forma que su presencia podría constituir un nuevo factor determinante de valores elevados de homocisteína, habiéndose observado su efecto en sujetos no fumadores, con estatus vitamínico normal, no portadores de genotipo TT de la MTHFR y en ausencia de otros factores conocidos que modulen la homocisteína²¹⁸.

Un mecanismo que explicaría la disfunción endotelial es la presencia de niveles elevados de dimetilarginina asimétrica (ADMA), un análogo de L-arginina inhibidor de la NO sintasa²¹⁹, por lo que ADMA se considera como un regulador de síntesis de NO y un potencial marcador de daño vascular²²⁰.

En 1986, se identifica la N^G-monometilarginina (L-NMMA) como un compuesto que inhibe el efecto citotóxico de macrófagos activados y previene la producción de nitritos y nitratos derivados de L-arginina en estas células²²¹.

Un año más tarde, se identifica el factor de relajación derivado de endotelio como óxido nítrico²²² y en 1988 Palmer y cols. demuestran por primera vez que el NO se sintetiza, en condiciones fisiológicas, por la acción de una enzima Ca²⁺ dependiente que utiliza como sustrato arginina, en un proceso que es inhibido por L-NMMA^{223,224}. Los tres análogos de L-arginina: la N^G-monometilarginina (L-NMMA), la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y la dimetilarginina simétrica (SDMA) modifican la síntesis de NO en sistemas biológicos.

La síntesis de ADMA está catalizada por la familia de enzimas proteína-arginina-N-metil transferasas²²⁵, que utilizan S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo (figura 1.3.4-2), razón por la que se ha sugerido que la síntesis de ADMA y el metabolismo de homocisteína están relacionados, habiéndose encontrado valores elevados de ADMA en distintos modelos de hiperhomocisteinemia^{226,227}. Este mecanismo explicaría porque la disfunción endotelial no se restaura, al reducir los niveles de homocisteína con tratamiento de vitamina B²²⁸.

Una vía de metabolismo de las metilargininas se inicia con la proteólisis y la salida de la

célula de los residuos de metilarginina al plasma, desde donde son filtradas por el riñón, sin que se reincorporen a las proteínas, por lo que la producción de metilarginina podría ser un índice de degradación proteica²²⁹.

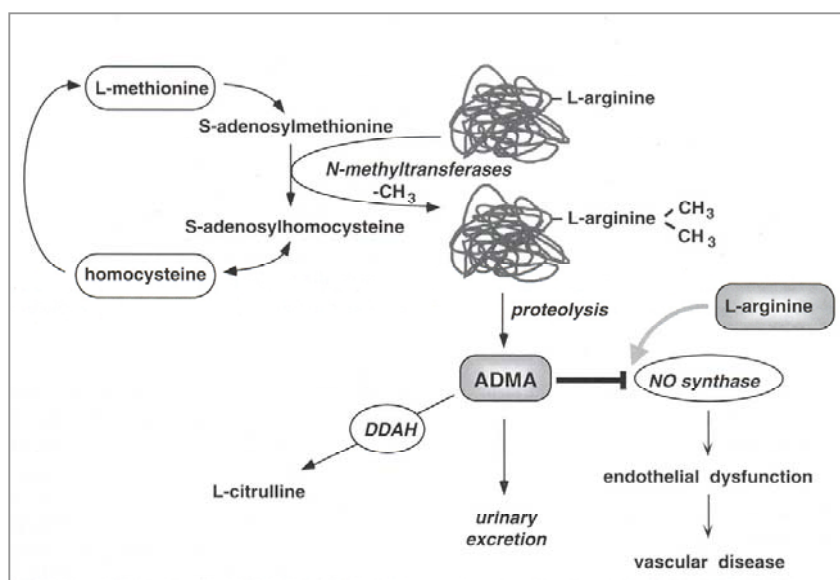


Figura 1.3.4-2 Rutas metabólicas relacionadas con ADMA. Ilustración tomada de Böger²³⁰

En 1987 se demuestra la existencia de una vía de catabolismo de ADMA a citrulina y dimetilamina, específica para los residuos de metilarginina asimétricamente metilados (L-NMMA y ADMA)²³¹, cuya enzima es dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH)²³². La DDAH metaboliza específicamente la dimetilarginina asimétrica y no hidroliza la simétrica (SDMA). La inhibición farmacológica de la actividad de DDAH²³³, lleva a una acumulación de ADMA libre en células endoteliales.

Las tres formas de metilargininas entran en la célula a través de transportadores de aminoácidos catiónicos, conocidos colectivamente como transportadores y⁺, que transportan también arginina, lisina y ornitina²³⁴. Dicho sistema concentra metilargininas en la célula. En la célula endotelial la concentración de L-NMMA intracelular puede alcanzar 5 veces la concentración extracelular. El sistema

transportador es inducible y está regulado por ciertas citoquinas como TNF- α e interleukina1 β ²³⁵.

La regulación de la concentración intracelular de metilarginina asimétrica por el sistema de la DDAH, podría constituir un nuevo mecanismo de regulación de la NOS.

La relevancia clínica de la vía arginina \rightarrow óxido nítrico en enfermedad vascular, ha sido demostrada en numerosas ocasiones. La síntesis de óxido nítrico, está alterada en enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, hipertensión y diabetes.

Los niveles de ADMA parecen alterados en pacientes con fracaso renal, hipertensión y en pacientes con hiperlipidemia e hiperhomocisteinemia

El aumento en la síntesis de ADMA y L-NMMA ó un descenso en la concentración de arginina, podría resultar en un descenso de la síntesis de NO, con reducción en la vasodilatación.

La presencia de residuos de arginina metilados en proteínas altamente específicas como proteínas básicas de mielina²³⁶, proteínas de choque térmico (Hsps)²³⁷ y proteínas nucleares²³⁸, se conoce desde hace tiempo, pero su función permanece sin aclarar.

La metilación de residuos de arginina en proteínas, se produce por la acción de la proteína arginina metil transferasa (PRMT), de la que se conocen dos subtipos en mamíferos, con diferente especificidad de sustrato²³⁹ y distinta actividad catalítica²⁴⁰.

La enzima específica de proteínas de mielina, cataliza la formación de L-NMMA y SDMA, mientras que la enzima no específica de proteína de mielina cataliza la formación de L-NMMA y ADMA y constituye la mayor fuente de metilargininas asimétricas, siendo éstas las únicas que inhiben la óxido nítrico sintasa (NOS).

➤ *Expresión de citoquinas y quimiocinas*

Estudios *in vitro* demuestran que la homocisteína activa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, en relación con su capacidad de activación del factor nuclear kappa B²⁴¹.

Las quimiocinas MCP-1 e IL-8 son liberadas por macrófagos en la lesión y han sido identificadas en placas de ateroma. En situación de hiperhomocisteinemia, se ha demostrado un incremento en la expresión y secreción de MCP-1 y IL-8 en cultivo de

monocitos obtenidos de células endoteliales^{242,243}. Este efecto está mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la NAD(P)H oxidasa, ya que la tHcy aumenta la producción de ROS y los inhibidores de proteína C reactiva. Estos datos sugieren que la tHcy puede alterar la función de monocitos humanos por aumento de la expresión de MCP-1 y IL-8, aumentando la formación de ROS.

➤ *Estrés oxidativo*

Numerosos trabajos han demostrado la capacidad de la homocisteína de aumentar la producción de radicales libres de oxígeno y dañar la disponibilidad de óxido nítrico por el endotelio²⁴⁴. El grupo -SH de la Hcy presenta la misma capacidad de oxidación-reducción que glutatión y cisteína, sin embargo debido a su baja concentración no se considera como el principal agente oxidante. Por otra parte la Hcy inhibe la expresión de diversas enzimas antioxidantes²⁴¹. Por tanto la Hcy actúa sensibilizando a la célula frente a agentes que generen estrés oxidativo.

La situación de hiperhomocisteinemia se ha asociado con el estrés oxidativo. La Hcy disminuye la expresión y secreción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) esencial para catalizar la dismutación del anión superóxido, protegiendo del estrés oxidativo. En mamíferos se han identificado tres isoformas de la SOD ubicadas en distintos compartimentos: 1) intracelular (Cu,Zn-SOD) 2) mitocondrial (Mn-SOD) y 3) extracelular (EC-SOD). La isoforma extracelular es la más abundante en tejido vascular. Se trata de una glicoproteína que contiene cobre y zinc, secretada por células musculares lisas vasculares y protege la pared vascular frente al estrés oxidativo^{245,246}. *In vitro* la homocisteína reduce la expresión de la EC-SOD, aumentando el estrés oxidativo en la pared vascular. El aporte de taurina restaura la expresión de EC-SOD, disminuyendo el estrés oxidativo²⁴⁷.

Durante la oxidación de la Hcy se generan anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), capaces de oxidar las lipoproteínas plasmáticas, especialmente las lipoproteínas de baja densidad LDLs, formando hidroxicolessterol, degradando los ácidos grasos poliinsaturados y modificando la Apo B100. Todos estos derivados están implicados en el proceso molecular de la aterogénesis^{72,86}.

➤ *Estrés del Retículo Endoplásmico*

La importancia del retículo endoplásmico (RE) en la vida celular en condiciones normales se conoce desde hace décadas, pero el papel que juega en la progresión de diversas enfermedades se conoce recientemente, desde que diversos trabajos soportan la idea de que una de las principales vías de estrés del RE es en respuesta al acúmulo de proteínas no plegadas (UPR)^{248,249,250}.

El RE desempeña un papel fundamental en el proceso de producción, plegamiento y exportación de proteínas a los diferentes compartimentos celulares ó al medio extracelular²⁵¹. La mayoría de proteínas secretadas, glicosiladas y modificadas son plegadas para dar lugar a sus estructuras terciarias y cuaternarias. Solo las proteínas correctamente plegadas se forman como oligómeros y son transferidas al aparato de Golgi. Para asegurar su correcto plegamiento, se requiere un sistema eficiente de moléculas caperonas²⁴⁸ que eviten acúmulo de proteínas nativas o incorrectamente plegadas en el RE.

El estrés del RE ocurre por acúmulo de proteínas desnaturalizadas o con errores de plegamiento²⁵². Esto provoca la respuesta del RE mediante el mecanismo funcional UPR, a través del cual la célula es capaz de defenderse. Dicho mecanismo incluye: 1) aumento de la síntesis lipídica necesaria para la formación de membranas de RE y disminución en la traslación proteica, evitando el acúmulo de proteínas no plegadas²⁵³, 2) inducción trasncripcional de proteínas caperonas del RE, para aumentar la capacidad de plegamiento y prevenir la agregación proteica²⁵³, 3) eliminación del RE de proteínas no plegadas, mediante un transporte acoplado al sistema ubiquitin- proteosomas para su degradación^{250,254}.

El RE es un compartimento altamente oxidado en todo tipo de células²⁵⁵, en donde la relación entre glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG) es 3:1, mientras que en el citosol es de 100:1 En las etapas iniciales de la UPR, se producen, por dos vías diferentes, altos niveles de especies reactivas de oxígeno²⁵⁶ (ROS) como anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y $^{\cdot}OH$. La primera vía es el proceso de plegamiento, en donde a través de la formación de puentes disulfuro, por acción de la

proteína disulfuro isomerasa dependiente de FAD, se generan 2 e⁻, que junto con las moléculas de oxígeno, dan lugar a la producción de ROS^{256,257}.

Una segunda vía de generación de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial. La depleción de glutatión reducido (GSH) por la UPR induce disfunción mitocondrial causando acúmulo de ROS²⁵⁶.

El acúmulo de proteínas no plegadas y una UPR prolongada, podría activar la vía de muerte celular²⁴¹, por activación de diversas proteínas del RE como la proteína quinasa transmembrana tipo 1 (IRE-1), el factor 6 de transcripción (ATF-6) y la proteína quinasa tipo PKR (PERK), que activarán diversas caspasas (caspasa-12 y caspasa-9) que darán lugar a la apoptosis²⁵⁸.

La hiperhomocisteinemia se ha descrito como causante de estrés del RE. La homocisteína podría provocar proteínas con error de plegamiento, alterando la formación de puentes disulfuro e induciendo la expresión de proteínas caperona como GRP78, GRP94 y GADD153 y la de una proteína no caperona denominada “*Herp*” o proteína del RE inducida por homocisteína²⁵⁹. A diferencia de otras proteínas inducidas por estrés en el RE, Herp es una proteína de 64kDa localizada en la membrana del RE, que se induce de forma mayoritaria en condiciones de estrés²⁶⁰. Su N-terminal posee un dominio ubiquitina, el cual está probablemente implicado en su degradación a través de la vía ubiquitin-proteosoma²⁵⁹.

Algunas de las funciones celulares de la proteína Herp se han ido conociendo gradualmente. Así, durante el estrés del RE, Herp actúa como un neuroprotector cerebral, estabilizando la homeostasis del Ca²⁺ y manteniendo la función mitocondrial, aumenta la capacidad del RE de plegamiento de proteínas, previene la apoptosis provocada por estrés del RE^{261,262}. Se ha descrito que Herp interactúa con presenelinas incrementando la producción de β -amiloide²⁶³.

El mecanismo a través del cual Herp ejerce su acción no está bien definido, pero tras la observación de la asociación entre niveles de homocisteína y metilación de ADN, se ha descrito recientemente, en pacientes con alcoholismo y niveles elevados de homocisteína, un descenso en la expresión del mRNA de Herp, así como un incremento

de la metilación en el ADN del promotor, por lo que la homocisteína regularía la expresión de Herp en un mecanismo que implica la metilación del ADN²⁶⁴.

1.4 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps)

En 1962 Ritossa²⁶⁵, describe por primera vez la respuesta al choque térmico inducida al someter a un aumento de temperatura transitorio, las glándulas salivares de la mosca de la fruta *Drosophila*. Las células, ante diferentes tipos de agresión causantes de estrés celular, desarrollan mecanismos de respuesta para su defensa entre las que se encuentra la inducción de genes específicos que codifican la familia de proteínas, conocidas como “proteínas de choque térmico” (Hsps), o proteínas del estrés. La expresión de Hsps en respuesta al estrés, se ha observado en células de todos los organismos estudiados (bacterias, plantas, levaduras, mamíferos, hombre), y presentan un elevado grado de conservación tanto en su estructura, como en mecanismos de regulación y función bioquímica²⁶⁶. La conservación de las secuencias genómicas de los genes de respuesta al estrés, ha saltado las barreras de las especies lo que ha permitido su adaptación a la evolución.

El choque térmico es un tipo de estrés que hace que las Hsps se sobreexpresen en la célula. Agentes estresantes diferentes como son procesos inflamatorios, estrés metabólico y oxidativo, fármacos citotóxicos, metales pesados, carcinógenos, ionóforos del calcio y radiaciones UV, inducen reacciones celulares similares, siendo capaces de activar las secuencias genómicas y el aumento de expresión de Hsps, para evitar posibles lesiones²⁶⁷, desempeñando un papel activo en la defensa celular.

Las Hsps juegan un importante papel como caperonas moleculares, siendo esenciales en procesos de plegamiento y ensamblaje de proteínas nuevamente sintetizadas, traslocación proteica y/o degradación, tanto en condiciones normales, como en condiciones de estrés. La agresión térmica ó de otro tipo, origina la desnaturalización de las proteínas, por lo que la señal de estrés se origina como consecuencia del flujo de proteínas desplegadas que requieren la intervención de caperonas moleculares, que facilitan el plegamiento de proteínas nativas, evitando la agregación de proteínas no plegadas o dañadas y asistiendo al replegamiento de proteínas desnaturalizadas²⁶⁸. Así mismo, las Hsps ayudan al transporte molecular a través de la membrana celular²⁶⁹ y están implicadas en la aportación de péptidos inmunogénicos en el sistema mayor de

histocompatibilidad para su presentación a las células T. Normalmente los antígenos endógenos son presentados por moléculas de la clase I del sistema mayor de histocompatibilidad, mientras que los antígenos exógenos son presentados por moléculas de clase II. Sin embargo los antígenos exógenos ayudados por caperona, son canalizados como endógenos y presentados por moléculas de clase I a células T tipo CD8+²⁷⁰.

Estas proteínas (Hsps) no solo se expresan en respuesta a la agresión celular, sino que en condiciones normales se expresan de manera constitutiva, y representan aproximadamente el 5-10% del total^{271,272} y regulan procesos celulares fundamentales, que van desde el plegamiento de proteínas²⁷³, actuando como carabinas moleculares ó caperona, hasta la prevención de la muerte celular programada^{274,275}.

Las Hsps se clasifican según su peso molecular (expresado en kDa), en seis grandes familias: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 y de bajo peso molecular. La nomenclatura Hsp se refiere a la proteína inducida por estrés, mientras que cuando se trata de proteína constitutiva, la nomenclatura se refiere a Hsc (ej:Hsc70).

Una selección de los miembros mas importantes, se recoge en la tabla 1.4-I²⁷⁶:

Familia HSP	Miembro	Localización	Actividad
Bajo peso molecular	Ubiquitina	Citoplasma/núcleo	Eliminación de proteínas desnaturalizadas
	Hsp10	Mitocondria	Cofactor de Hsp60
	Hsp27	Citoplasma/núcleo	Estabilización del citoesqueleto
	Aβ-cristalinas	Citoplasma	Actina intracelular
HSP40	Hsp40	Citoplasma/núcleo	Regula actividad de Hsp70. Caperona molecular
	Hsp47	Retículo endoplásmico	Pro-colágeno
HSP60	Hsp60	Mitocondria	Caperona molecular (Caperonina)
HSP70	Hsp72 (Hsp70i)	Citoplasma/núcleo	Inducible por estrés
	Hsp73 (Hsc70)	Citoplasma/núcleo	Constitutiva. Caperona molecular
	Hsp75 (Mtp70)	Mitocondria	Inducible por estrés, incluida hipoxia
HSP90	Hsp90	Citoplasma (migra al núcleo)	Parte del complejo hormona-receptor
HSP110	Hsp110	Nucleolo/citoplasma	Tolerancia térmica
	Hsp105	Citoplasma	Plegamiento protéico

Tabla 1.4-I Relación de familias y miembros más importantes de Hsps. Localización y actividad

Las Hsps están presentes en citosol, mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo. Su vida media es del orden de 48 horas²⁷⁷. Las Hsps se movilizan constantemente en el interior de la célula y las funciones de cada una de ellas depende de su localización, aunque los mecanismos que participan en este proceso no han sido bien establecidos. Así, las Hsp90 ejercen su función en ambas localizaciones citosólica y nuclear, mientras que la familia de las Hsp70 presentan un patrón complejo de regulación del crecimiento y expresión de genes inducidos por estrés, encontrándose en diferentes compartimentos²⁶⁵.

Dentro de la familia de las HSP70, la Hsp73 (Hsc70) se expresa de forma constitutiva y es poco o nada inducible por estrés, mientras que la Hsp72 (Hsp70i) es inducida exclusivamente por estrés²⁷⁸. Ambas proteínas están localizadas en el citoplasma/núcleo de la célula y presentan una alta homología (90%) en su secuencia, por lo que podrían desempeñar funciones similares. Sin embargo la presencia de diferentes miembros de la familia HSP70 en el mismo compartimento celular, indicaría su compromiso con diferentes funciones. Así la Hsc70 une polipéptidos nacientes con polisomas, mientras que la Hsp70i se asocia a ribosomas²⁷⁹.

Otro grupo de proteínas de estrés, conocidas como proteínas GRP, a diferencia con las Hsps, se expresan en células sometidas a situaciones de privación de glucosa ó tratamiento con ionóforos de Ca^{2+} , mientras que no se expresan por aumento de temperatura. Al igual que las Hsps se designan por su masa molecular. Una de ellas, la GRP78 es la mejor caracterizada. Inicialmente denominada BIP (*binding immunoglobulin protein*), ya que fue identificada unida a cadenas pesadas de inmunoglobulinas²⁸⁰, se localiza en el retículo endoplásmico y actúa como caperona constitutiva.

La familia de las caperona molecular HSP70 son ATPasas muy conservadas, cuya estructura tridimensional completa se desconoce. Las Hsp70 están formadas por 3 dominios^{277,281}: 1) sitio de unión a ATP, localizado en la región N-terminal de 44kDa y con actividad ATPasa, 2) situado en la región C-terminal, segmento de 18kDa, con capacidad de unión al péptido, 3) un tercer dominio carboxiterminal, de 10kDa variable.

El fragmento de 44 kDa N-terminal que comprende los residuos de aminoácidos 1-386, caracterizado por cristalografía de rayos X, posee 4 dominios formando 2 lóbulos con una hendidura, tal como se recoge en la figura 1.4-1. El sitio de unión a ATP es la región más conservada a lo largo de los diferentes miembros de la familia HSP70 y entre las diferentes especies.

El dominio de unión peptídico, comprende los residuos 384-543 y está constituido por 2 grupos de 4 ramales con láminas β antiparalelas, y una hélice α .

El dominio C-terminal de 10kDa que comprende los residuos 542-646, está formado por una hélice α seguido de un fragmento rico en glicina/prolina próximo a la secuencia terminal altamente conservada EEVD. Los 4 aminoácidos terminales están presentes en todas las Hsp70 y Hsp90 eucariotas y afectan a la cantidad de mRNA transcrito durante el choque térmico.

Este dominio C-terminal puede ser diferente entre los distintos miembros de HSP70. Así el el dominio C-terminal de Hsp70 tiene 6 residuos menos y difiere en 26 aminoácidos en relación a Hsc70.

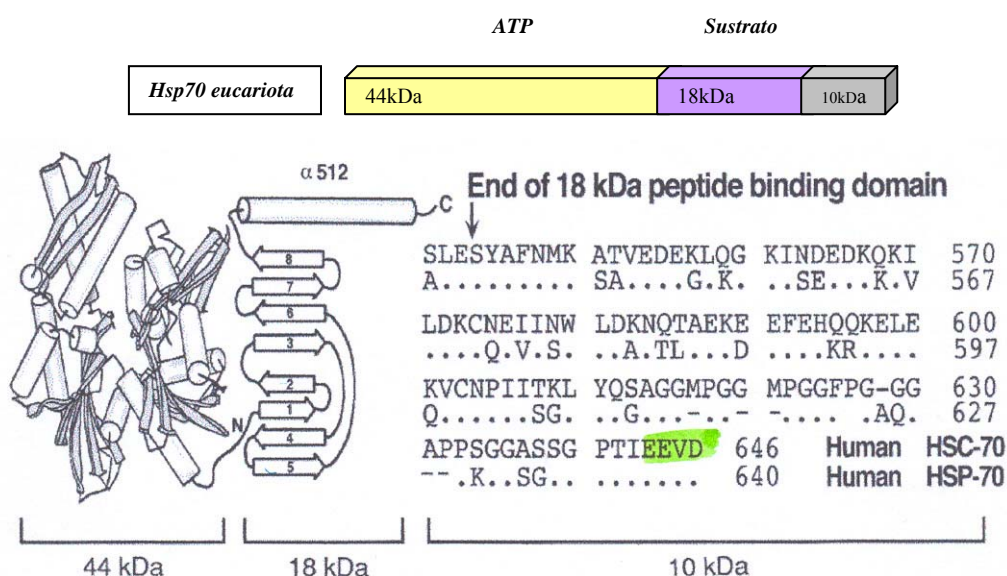


Fig 1.4-1 Esquema de la estructura de la Hsp70 eucariota tomada de Kiang²⁷⁷

La unión del Hsp70 a su sustrato es reversible y se acopla al ciclo de hidrólisis de ATP y a cambios conformacionales²⁸². Brevemente el mecanismo de unión descrito²⁸¹ es: la Hsp70 se asocia a ATP y a dominios hidrofóbicos proteicos. La afinidad por el sustrato aumenta con la hidrólisis de ATP→ADP, prolongando el tiempo de interacción con la proteína. La actividad ATPasa de la Hsp70 es estimulada por otras Hsps y requiere de un cofactor, la Hsp40, para su unión al sustrato. Después del cambio de ADP por ATP, el sustrato es liberado y el ciclo comienza de nuevo. El polipéptido liberado es dirigido hacia la vía de plegamiento proteico celular, compuesto por diversas caperonas.

En células eucariotas, la unión a sustrato de las Hsp70 presenta mayor afinidad por péptidos hidrofóbicos, afinidad que se incrementa tras hidrólisis de ATP. Así, son capaces de unir 2 tipos de péptidos: 1) aquellos que contienen más residuos hidrofóbicos y aromáticos, tales como FYQLALT, estimulando la actividad ATPasa y 2) aquellos que contienen residuos hidrofóbicos y básicos como NIVRKKK, con baja capacidad de estimular la actividad ATPasa.

La reversibilidad de unión al sustrato es de gran relevancia en el proceso de plegamiento y translocación proteica. Así la unión de las Hsp70 al sustrato hidrofóbico de polipéptidos nacientes mantiene la cadena naciente en un estado de plegamiento parcial hasta que la translación se ha completado, de forma que el nuevo polipéptido sintetizado puede alcanzar su conformación final a través de la vía de plegamiento proteico.

La función principal de las proteínas de estrés es regular la homeostasis celular y promover la supervivencia²⁸³. La inducción de la respuesta al estrés es inmediata y se produce en unos minutos posterior al daño, aumentando la expresión de los genes que codifican las Hsps. Un incremento de 5-10°C de temperatura sería suficiente para desencadenar la respuesta.

La respuesta de choque térmico está regulada a nivel transcripcional. La activación de los genes *hsp* está regulada por uno o más factores de transcripción denominados factores de choque térmico (HSF). Estos factores son proteínas transreguladoras, localizadas en el citoplasma en forma de monómero que necesitan activarse (oligomerización) para su translocación al núcleo y su posterior unión al elemento regulador (HSE). El HSE posee una secuencia básica pentamérica 5'-nGAAn-3'. El

número de repeticiones es variable, pudiendo ser funcional a partir de 2-3 pentámeros²⁸⁴. La secuencia consenso del HSE se localiza en el promotor del gen *hsp70*, aguas arriba de la secuencia TATA^{285,286,287}. El HSE de la HSP70 se compone de cinco unidades pentaméricas.

Existen dos mecanismos de acción posibles: 1) descrito en levaduras, en donde el HSF se une directamente al HSE, formando un complejo HSF-HSE activado por la fosforilación de HSF y 2) descrito en organismos superiores, en donde en condiciones normales el HSF se encuentra formando complejo con la Hsp70.

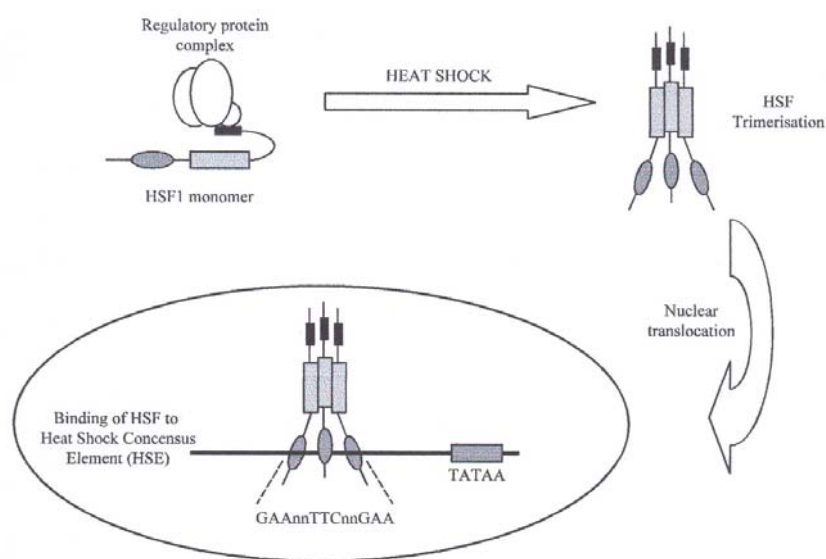


Figura 1.4-2. Esquema de la regulación de la expresión de proteínas de choque térmico. Ilustración tomada de Lamb et al²⁸⁷.

Por acción del agente estresante, el HSF es liberado dando lugar a la formación del trímero correspondiente que es capaz de unirse al HSE, activando la expresión del gen *hsp*, incrementando la síntesis de Hsp70. Para evitar la acumulación de Hsp70 intracelular, la Hsp activa se une de nuevo al HSF formando el complejo HSF-Hsp70, lo que da lugar a la disociación del HSF del ADN.

Se han descrito varios miembros de la familia HSF (HSF1-4). Todos ellos presentan dos regiones muy conservadas. Un dominio N-terminal de unión al ADN de aproximadamente 100 aminoácidos y un dominio adyacente de trimerización de

repeticiones hidrofóbicas (cremalleras de leucina), capaz de formar interacciones hidrofóbicas. En eucariotas existe un tercer dominio, menos conservado, en la zona C-terminal que previene la trimerización del HSF en condiciones normales e inicia la activación de la transcripción. En mamíferos se han descrito dos tipos diferentes de HSFs (HSF1 y HSF2). HSF1 está involucrado en la regulación de la expresión de Hsps en respuesta a agentes estresantes celulares, como temperatura, metales pesados y análogos de aminoácidos, mientras que HSF2 parece estar involucrado en la diferenciación celular²⁸⁸.

El acúmulo intracelular de las Hsps puede provocar daños citotóxicos, por lo que la síntesis de Hsps, es un proceso regulado, en el que se limita la expresión de los *hsp*. Se ha descrito que en ausencia de estrés, el acúmulo de Hsps afecta a la división celular²⁸⁹. En la respuesta al estrés no solo se produce la expresión de Hsps, sino que también se produce la inhibición de la síntesis de otras proteínas. Así, la respuesta al estrés inhibe la expresión de citoquinas en leucocitos²⁹⁰ y fibroblastos²⁹¹, así como la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mediada por citoquinas²⁹².

Las Hsps están implicadas en la patogénesis de numerosas enfermedades, tales como artritis, diabetes mellitus, esquizofrenia y aterosclerosis²⁹³. Se ha demostrado que estas proteínas pueden proteger de la isquemia los cardiomiocitos o inducirse en células de la pared arterial con hipertensión aguda o sometida a angioplastia²⁹⁴. Se ha descrito que la expresión de Hsps en células tumorales ó células infectadas genera una respuesta inmune celular²⁹⁵, sugiriendo la modulación de una respuesta inmune que activa linfocitos T y proporciona una defensa adicional contra la infección y la transformación celular, aumentando la sensibilidad a la lisis mediada por células NK efectoras²⁹⁶.

Existe una relación entre el estrés oxidativo y la inducción de los genes *hsp*. Se ha descrito que la síntesis de especies reactivas de oxígeno producidas como consecuencia del estrés oxidativo provocado por ciclosporinas²⁹⁷, inducen la expresión de Hsp70, lo que proporciona una mayor resistencia al estrés oxidativo.

En relación con la aterosclerosis, la familia de las Hsp60 y Hsp70, han sido las más estudiadas. La evidencia acumulada sugiere que las Hsp70 proporcionan protección

miocárdica, especialmente en modelos experimentales de daño en isquemia reperCUSión^{298,299}. Se ha demostrado que las Hsp60 juegan un importante papel pro-aterogénico y se han podido localizar en la lesión producida en la íntima, mientras que no ocurre así en las regiones sin lesión³⁰⁰. Existe evidencia del incremento de la expresión de Hsp60 por células endoteliales activadas³⁰¹.

En lesiones avanzadas, las Hsp70 se sobreexpresan en numerosas células, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y células del músculo liso, habiéndose aislado *in vitro* células T en respuesta específica a las Hsp65³⁰². En lesiones producidas por inmunización con Hsp60, en ausencia de otros factores de riesgo, se ha demostrado que la inmunización es insuficiente para producir aterosclerosis en periodos prolongados. *In vivo*, la inmunización con la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guerin) incrementa la aterosclerosis³⁰³, habiéndose descrito un rápido incremento de anticuerpos circulantes anti-Hsp60 posterior a la inmunización. Sin embargo en la lesión precoz solo las células dendríticas, células clave en la respuesta inmune, sobreexpresan Hsp70³⁰⁴. Sobre la base de la homología entre las Hsp60 microbiana y humana, el desarrollo de la respuesta inmune a las Hsp60, podría ser responsable del daño celular producido en la aterosclerosis³⁰⁵.

Las Hsps son proteínas que se localizan habitualmente en el interior de la célula, sin embargo se pueden encontrar en forma soluble en plasma junto con anticuerpos anti-Hsps específicos. Así, algunos estudios sugieren una correlación entre los niveles circulantes de anticuerpos y la severidad de la aterosclerosis^{306,307}.

Las Hsps se han estudiado en relación con otros factores de riesgo clásicos para el desarrollo de la aterosclerosis y también como factores de riesgo independiente. Se ha podido demostrar correlación entre niveles elevados de Hsp60 y colesterol-LDL³⁰⁸. En un grupo de sujetos con hipertensión arterial, se han encontrado niveles de anticuerpos anti-Hsp70 elevados frente a sujetos normotensos³⁰⁹, habiéndose observado que los anticuerpos pudieran tener un efecto protector, modificando el progreso de la aterosclerosis³¹⁰. Los niveles de anticuerpos anti-Hsp60 se han relacionado con el grosor de la íntima en arterias femoral y carotídea³¹¹. Las Hsps pueden tener significación como factor pronóstico de morbilidad y mortalidad en aterosclerosis,

habiéndose observado niveles de anticuerpos anti-Hsp65 en individuos que tuvieron un evento cardiovascular, superiores a los que no tuvieron³¹².

La respuesta de choque térmico permite que células y organismos toleren ciertas situaciones de estrés, que de no ser así podrían resultar letales.

1.5 GEN hsp70

El complejo mayor de histocompatibilidad³¹³ (CMH) localizado en el brazo corto del cromosoma 6, comprende entre 3-4 mega pares de bases (Mpb) del ADN. En la región telomérica, se encuentra la región de clase I del CMH, con al menos 17 genes altamente relacionados que incluyen aquellos que codifican los antígenos clásicos de histocompatibilidad (HLA-A, B y C). En el centrómero se localiza la región de clase II (HLA-D) que consta de cuatro subregiones denominadas DP, DO/DZ, DQ y DR. Las moléculas de clase I y II, son glicoproteínas involucradas en la regulación inmunológica, que actúan como elementos de restricción e interacción en el reconocimiento por parte de las células T de células diana.

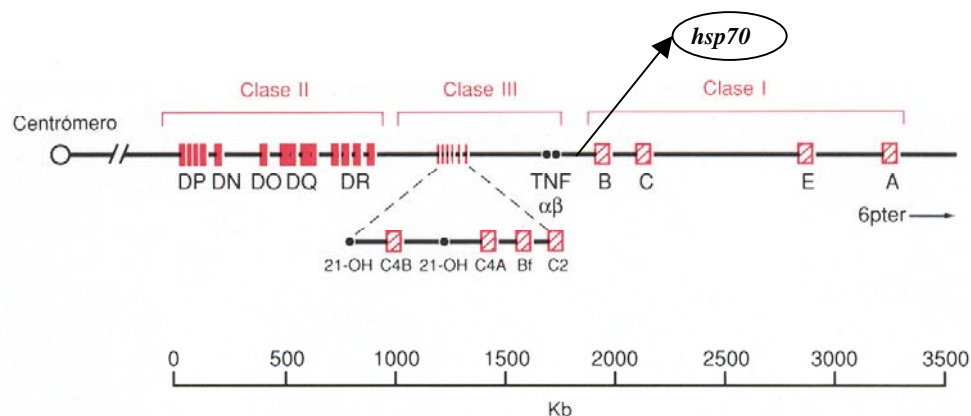


Figura 1.5-1 Esquema del complejo mayor de histocompatibilidad tomado de Thompson³¹⁴ y localización del gen hsp70

Entre los genes de clase I y II, se encuentra la región de clase III, cuya extensión es de aproximadamente 1000 kilobases de ADN. La región de clase III contiene una serie de genes heterogéneos que comprenden: componentes del sistema del complemento como C2, factor B y C4, el citocromo P₄₅₀ esteroide 21- α -hidroxilasa microsomal, citoquinas

como el factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β) y una proteína con una inusual estructura periódica denominada RD.

A finales de los años 80 se publica^{315,316} el hallazgo de un nuevo miembro del complejo mayor de histocompatibilidad, localizado en la región de clase III, entre el complemento y los genes TNF. Este nuevo miembro se refiere al conjunto de genes *hsp70*, que codifican las proteínas de choque térmico (Hsp70).

En humanos, 11 isoformas de Hsp70 están codificadas por diferentes genes *hsp70* localizados en locus dispersos. Dentro de la familia de genes *hsp70*, tres de ellos (*hsp70-1*, *hsp70-2* y *hsp70-Hom*) se localizan en tándem en la región de clase III del CMH, en el brazo corto del cromosoma 6 en la región 6p21.3. La localización del locus *hsp70* en esta región, sugiere el posible papel de las Hsps en enfermedades autoinmunes e inflamatorias^{317,318}.

Se ha identificado la existencia de un “locus” duplicado³¹⁷, cuyos genes *hsp70-1* y *hsp70-2* codifican para una proteína idéntica³¹⁹ de 641 aminoácidos (HSPA1A y HSPA1B), que constituye la principal proteína de choque térmico inducible (Hsp70). Un tercer gen (*hsp70-Hom*) localizado a 4 Kb del gen *hsp70-1*, codifica para una proteína más básica, también de 641 con un 90% de similitud a HSPA1A, denominada HSPA1L.

Los genes *hsp70-1* y *hsp70-2* se expresan a niveles altos, cuando la célula es sometida a choque térmico (42°C). El gen *hsp70-1*, se expresa también, aunque a niveles bajos, de forma constitutiva. El gen *hsp70-Hom*, posee una secuencia en la zona 5'flanqueante que aunque no corresponde con la secuencia consenso para proteínas de choque térmico, se expresa a bajos niveles de forma constitutiva y tras choque térmico. Existe discrepancia acerca de su expresión tras choque térmico

El gen *hsp70-1*, que codifica para la mayoría de las proteínas de choque térmico inducidas por stress, está constituido por tres exones, no posee intrones y puede dar lugar a “*splicing*” alternativos³²⁰. El gen *hsp70-1* se conoce también como: *hsp72*, *hspa1*, *hspa1b* y en la actualidad se denomina como *hspa1a*, que codifica para la proteína HSPA1A, con referencia NT_007592.14. El intervalo de nucleótidos del gen

es: 22641588..22643970. Su código de identificación y acceso al banco de datos GenBank es gi:51465675. La secuencia está disponible en internet en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

El estudio secuencial de estos 3 genes, ha permitido la identificación de diversos polimorfismos localizados tanto en la región codificante, como en la región reguladora y del promotor. Así, en el gen *hsp70-Hom*, han sido identificados dos polimorfismos (SNPs) en la región codificante. Uno de ellos, la 2437T>C, da lugar al cambio de una metionina por treonina en el aminoácido 493 de la proteína (HSPA1AL), en el dominio 18KDa implicado en la unión al sustrato, modificando su efectividad de unión. El segundo SNP: 2763 A>G, da lugar al cambio de glutámico por lisina en el aminoácido 602 localizado en el dominio C-terminal de la proteína, región implicada en la unión al sustrato y en la unión a otras caperonas³²¹, disminuyendo las fuerza de unión hidrofóbicas.

En el gen *hsp70-1*, se han identificado algunos polimorfismos localizados en el promotor y en la región 5'flanqueante del gen que codifica para la proteína HSPA1A, aguas arriba del elemento regulador HSE de respuesta al choque térmico³²². El polimorfismo -110 A>C localizado 3 pares de bases aguas arriba de HSE, parece que no afecta la unión del HSF al HSE³²³ y por tanto a la síntesis de Hsp70.

Hasta el momento, no han sido descritos polimorfismos en la región codificante de los genes *hsp70-1* y *hsp70-2*, ni variaciones de aminoácidos en la secuencia proteica de la Hsp70³²⁴.

Variantes génicas en la secuencia de los distintos *hsp70*, parecen estar implicadas en diferentes enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas. Así, en modelo animal, se ha descrito la sobreexpresión de *hsp1a* en lesiones de aorta con aterosclerosis, mientras que en regiones sin lesión, el gen no se expresa³²⁵. La identificación de polimorfismos en los 3 genes ha permitido su asociación con diversas situaciones clínicas. Así, el polimorfismo 1267 A>G descrito en el *hsp70-2* para HSPA1B se ha asociado a susceptibilidad de shock séptico en neumonías³²⁶ y se ha relacionado con enfermedad psiquiátrica, especialmente en esquizofrenia³²⁷. Un

segundo polimorfismo el -179 C>T, se asocia con niveles bajos de expresión del gen y se ha sugerido la posibilidad de que ambos genes estén relacionados³¹⁸.

Otras mutaciones descritas en *hsp70-1* para HSPA1A, como la -27 G>C y en el *hsp70-Hom* para HSPA1L, como el SNP: 2437C>T, se han asociado con enfermedades inflamatorias³²⁸ y con el proceso de envejecimiento³²⁹.

1.6 LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS

Los leucocitos granulocitos polimorfonucleares son elementos formes que poseen un núcleo lobulado y contienen en su citoplasma gránulos específicos. Existen 3 tipos: a) polimorfonucleares neutrófilos, b) eosinófilos y c) basófilos.

Son células de 12 a 15 µm de diámetro. Su núcleo está formado por 2 a 5 lóbulos de cromatina condensada unidos entre sí. Poseen abundante citoplasma relativamente pobre en organelos que contienen dos variedades de gránulos que se tiñen poco con los colorantes usuales. Los gránulos específicos contienen fosfatasa alcalina, colagenasa, lactoferrina y proteínas básicas como lisozimas y fagocitinas y los granos azurófilos a lisosomas primarios. El citoplasma es en general pobre en otros tipo de organelos. En el tejido conjuntivo, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), tienen una vida media en de 1 a 4 días.

Además de gránulos movilizables intracelulares, del tipo lisosomal o secretorio, los PMNs contienen también orgánulos exocíticos de almacenamiento, -las vesículas secretoras-, que actúan como un importante reservorio de proteínas de membrana. Estos orgánulos citosólicos (gránulos y vesículas) proporcionan a los neutrófilos la capacidad de responder a diversos cambios de su entorno, lo que dispara procesos estrechamente regulados, tales como la migración y adherencia a los tejidos inflamados, la liberación de proteínas citotóxicas y proteolíticas y especies reactivas de oxígeno implicadas en la defensa del huésped, así como la fagocitosis. A pesar de la alta complejidad del metabolismo y tráfico proteico de los PMN, que les permite la exocitosis o la traslocación diferenciada de proteínas almacenadas en diferentes orgánulos citosólicos, el estudio de los PMNs adolece de forma sistemática de un análisis de su contenido

proteico global. Un análisis proteómico de los PMN bajo diferentes condiciones fisiológicas (genotipo *hsp70*), podría proporcionar la base para la elucidación de los procesos fisiológicos que controlan la biosíntesis de las proteínas granulares y vesiculares, su expresión y exocitosis o traslocación en respuesta a diferentes estímulos biológicos.

Los PMN constituyen un mecanismo de defensa y pertenecen a la primera línea de reconocimiento y de defensa ante agresiones externas, pudiéndose considerar como eficaces biosensores con capacidad biosintética selectiva tanto de mRNA como de proteínas. Ello les confiere la capacidad de responder frente a las agresiones y modular la respuesta frente a las mismas. El incremento de la actividad oxidativa de los PMN se observa en procesos de inflamación aguda y crónica como el shock séptico, el síndrome del distrés respiratorio del adulto, la artritis reumatoide, el enfisema o el asma y parecen estar también implicados en los procesos lesivos sobre tejidos miocárdicos infartados. Por todo ello, se relaciona el sistema Hsps en PMN no sólo con procesos de reparación, sino también con los de autoprotección frente a las distintas especies reactivas de oxígeno, originadas tras la activación celular y minimizando, por otro lado, el daño oxidativo sobre los tejidos implicados. Los PMN neutrófilos, por tanto, ejercen un papel fundamental tanto en la respuesta inflamatoria como en la defensa del huésped frente a diferentes patógenos.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El trabajo se basa en las siguientes puntos:

- 2.1. La aterosclerosis, como enfermedad inflamatoria crónica, induce la síntesis de Hsps en el lugar de la lesión y en las células implicadas en la misma.
- 2.2. Las Hsps son moléculas inmunomoduladoras que pueden actuar como potentes autoantígenos. Su reconocimiento por los linfocitos T desencadenaría una respuesta autoinmune que estaría implicada en la etiopatogenia inflamatoria de la aterosclerosis.
- 2.3. La hiperhomocisteinemia, considerada como factor de riesgo vascular independiente, parece inducir una situación de estrés oxidativo en el retículo endoplásmico.
- 2.4. La expresión elevada de Hsp70i en relación con determinados polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70-1*, podría explicar la resistencia individual ó de determinadas poblaciones ante determinados agentes estresantes ambientales, o factores de riesgo vascular. La presencia ó no de SNPs relacionados con la síntesis de Hsp70i, podría clasificar a los individuos en “hipo”, “normo” e “hiper” productores de Hsp70i. Individuos clasificados como “hiper”, constituirían un fenotipo “más sano”.

3. OBJETIVOS

3. **OBJETIVOS**

Se plantean en este trabajo los siguientes objetivos:

- 3.1. Estudio epidemiológico de los niveles de proteína C reactiva, homocisteína total y de la biología de las proteínas de choque térmico, así como su relación y sus correlaciones con homocisteína y proteína C reactiva, en la muestra poblacional reclutada, con o sin factores de riesgo vascular.
- 3.2. Estudio del polimorfismo 677C>T del gen que codifica la enzima metiltetrahidrofolato reductasa y su influencia sobre los niveles de homocisteína, así como sobre las Hsps.
- 3.3. Estudio de los polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70-1* en la muestra aleatoria de población general estudiada, con o sin factores de riesgo vascular.
- 3.4. Estudio de la influencia de los polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70* sobre los niveles de proteínas de choque térmico, anticuerpos anti-Hsps, homocisteína y proteína C reactiva.
- 3.5. Estudiar la biología de las Hsps en la aterosclerosis y analizar si en la enfermedad vascular existe un componente inmunológico que incluya reactividad de las Hsps.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL y MÉTODOS

4.1. *SUJETOS*

La población estudiada incluye personas voluntarias, trabajadores (activos o no) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los criterios de inclusión establecidos en el estudio fueron:

- 1) personas de ambos sexos, de edad comprendida entre los 40 y 60 años,
- 2) y que otorgan su consentimiento informado. El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación y la Comisión de Ética de la Investigación Clínica del Centro.

Los criterios de exclusión aplicados fueron:

- Mujeres gestantes ó lactantes
- Sujetos con infección sistémica en los últimos tres meses
- Sujetos que presenten:
 - Enfermedad oncológica o se hallen en tratamiento radio/quimioterápico
 - Enfermedad autoinmune (artritis reumatoide, lupus eritematoso, sarcoidosis)
 - Trastornos endocrinos (excepto diabetes)
 - Enfermedad hepática
 - Insuficiencia renal, glomerulonefritis
 - Trastorno cardíaco congénito
 - Enfermedad oncohematológica

En un periodo de 5 meses, se reclutaron 106 voluntarios seleccionados en entre abril de 2004 y junio de 2005 y estratificada por sexo. Todos ellos cumplen los criterios de inclusión establecidos en el estudio.

Así mismo se incluyen en el estudio 5 pacientes con patología vascular (3 mujeres y 2 varones), 3 de ellos ingresados en el hospital y los otros 2 pacientes ambulatorios en seguimiento extra hospitalario, a los que se detectó una hiperhomocisteinemia moderada en el momento del estudio. Tras la entrevista se incorporan al estudio 4

miembros de la familia de uno de los pacientes, 3 de los cuales presentan edades comprendidas entre 30 y 40 años. Uno de ellos había sufrido un evento cardiovascular 2 años antes. Todos los pacientes y familiares otorgaron el consentimiento informado.

El estudio se realiza sobre un total de 115 personas, 58 mujeres y 57 varones.

4.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se concierta una cita con todas las personas incluidas en el estudio, en la que se informa de los objetivos, procedimientos, beneficios y riesgos del trabajo y se solicita el consentimiento escrito para su participación.

El modelo de consentimiento informado que se utiliza se recoge en la fig.4.2-1

En la entrevista se realiza anamnesis y encuesta epidemiológica, que incluye edad, antecedentes médicos personales y familiares, tratamientos y aparición o presencia de enfermedad aguda o crónica. Se toma presión arterial y se realiza la extracción de sangre para las determinaciones analíticas correspondientes.

Se acuerda la entrega del informe con los resultados analíticos objeto del estudio.

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	
ANEXOS	Expediente N°
ANEXO I : CONSENTIMIENTO INFORMADO	
TÍTULO: ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, HIPERHOMOCISTEINEMIA Y PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DEL POLIMORFISMO DE <i>hsp 70i</i> Y SU EXPRESIÓN	
INVESTIGADOR PRINCIPAL :	
INTRODUCCIÓN <p>Antes de tomar parte en este estudio es importante que lea y comprenda la siguiente explicación en la que se describen el objetivo, los procedimientos, los beneficios y los riesgos de participar en el estudio.</p> <p>Es importante que me tome el tiempo que crea necesario antes de decidir mi participación.</p>	
ANTECEDENTES Y OBJETIVO <p>Este estudio se basa en el estudio de unas proteínas, denominadas "proteínas de choque térmico" (HSPs) que se incrementan bajo situaciones adversas, proteínas cuyos genes se expresan ante diferentes estímulos y que su producción podría condicionar la aparición de determinadas enfermedades.</p> <p>Se me ha explicado que el objetivo de este trabajo es determinar la concentración de HSP 70i en la población general adulta (40–60 años) o en pacientes portadores de factores de riesgo vascular y examinar si la existencia de concentraciones altas es un factor de protección para padecer enfermedades.</p>	
PROCEDIMIENTOS <p>Si doy mi consentimiento para participar sucederá lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Responderé a unas preguntas sobre mi historia médica que durará aproximadamente 30 minutos. 2. Me extraerán sangre de la vena de un brazo (unos 25 ml). 	
BENEFICIOS <p>Es muy probable que no se produzca ningún beneficio directo sobre mí por participar en este estudio, pero puede ser que con la información que se obtenga de este estudio se pueda predecir y con ello evitar determinadas enfermedades, especialmente del ámbito cardiovascular en el futuro.</p>	
RIESGOS <p>Los riesgos que tengo por extraerme sangre de la vena de un brazo son mareo, hematoma, hemorragia en el punto de la inyección y/o dolor. También existe una pequeña posibilidad de infección.</p>	
CONFIDENCIALIDAD <p>Los resultados de los análisis se me comunicarán. Toda la información obtenida sobre mí en este estudio será considerada confidencial y será usada solo a efectos de investigación. Mi identidad será mantenida confidencial en la medida en que la ley lo permita.</p>	
VOLUNTARIEDAD <p>Mi participación en el estudio es completamente voluntaria y soy libre de abandonarlo en cualquier momento sin tener que dar explicaciones.</p> <p>D/Dª ha discutido esta información conmigo y se ha ofrecido a responder a todas mis preguntas y dudas y a ponerme en contacto con él/ella siempre que tenga más preguntas que realizar en el teléfono:</p>	
CONSENTIMIENTO <p>D/Dª con DNI..... declaro que he sido informado suficientemente sobre las características del estudio en que voy a participar. Por ello, doy mi libre consentimiento para integrarme en él. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno. He recibido una copia de este documento y he tenido la oportunidad de leerlo.</p> <p style="text-align: right;">Firma del participante Fecha: ____/____/200__</p> <p>Dr. D/Dª como parte del equipo investigador he informado al participante del estudio acerca del objetivo, procedimientos, beneficios y riesgos de participar en el estudio.</p> <p style="text-align: right;">Firma de la persona que informa Fecha: ____/____/200__</p>	

Figura 4.2-1 Modelo de consentimiento informado, entregado a los participantes en el estudio.

4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre se obtienen por venopunción. Se establece el volumen y tipo de muestra (suero ó plasma) necesario para las determinaciones analíticas previstas, y se extraen:

- 5 ml de sangre recogidos sobre tubo con gel separador para obtención de suero y estudio bioquímico que incluye los siguientes analitos: Colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y glucosa.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA (anticoagulante) para medición de homocisteína total plasmática.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA para extracción de ADN y estudio de polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa.
- 2 ml de sangre recogidos sobre tubo seco para medición de: RCP, HSP70i y anticuerpos anti HSP70 y anti-HSP60 en suero.
- 10 ml de sangre recogidos sobre tubo con EDTA, para el aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos por gradiente.

4.4 REQUISITOS PREANALÍTICOS

Las muestras obtenidas para el estudio bioquímico, se envían al Servicio de Bioquímica, siguiendo las indicaciones establecidas por éste y se procesan dentro de la rutina diaria, sin que se requiera precauciones especiales en la preanalítica.

Sin embargo, se deberá cumplir los requisitos específicos de preanalítica para las siguientes determinaciones:

- Los tubos conteniendo las muestras de sangre obtenidas para la medición de homocisteína, se trasladan en frío al laboratorio. El tiempo transcurrido desde la extracción de sangre hasta la separación del plasma por centrifugación, no debe superar los 60 minutos. El plasma se almacena a -40°C hasta su cuantificación.
- Las muestras obtenidas para el aislamiento de PMN se trasladan de inmediato al laboratorio de Biología Celular para proceder a su extracción, no siendo

necesario su transporte en frío. El tiempo transcurrido desde la obtención de sangre hasta la extracción en el laboratorio debe ser inferior a 30 minutos.

4.5 VALORACIÓN DE RIESGO VASCULAR. CLASIFICACION DE LOS SUJETOS PARTICIPANTES.

El riesgo absoluto de desarrollar una enfermedad cardiovascular en un periodo de tiempo, generalmente establecido en diez años, se estima basándose en la presencia de enfermedad coronaria previa y en la valoración conjunta de los factores de riesgo presentes³³⁰. Se consideran individuos de alto riesgo aquellos que posean un riesgo absoluto superior al 20%³³¹. El cálculo de riesgo en individuos asintomáticos se realiza sobre la presencia de factores de riesgo. Para ello existen diversas tablas basadas en el seguimiento de la población del estudio Framingham³³². Las más utilizadas son las derivadas del propio estudio^{333,334} y la carta de riesgo coronario de la *Task Force*³³¹, recogida en la figura 4.5-1. El índice de riesgo coronario de los individuos participantes se obtuvo considerando la presencia o ausencia y grado de severidad de cada uno de los factores de riesgo convencionales, teniendo en cuenta el sexo, la edad, estatus de fumador, tipo de vida, obesidad, presión arterial sistólica y colesterol total. La tabla recoge los criterios establecidos para considerar una determinada situación.

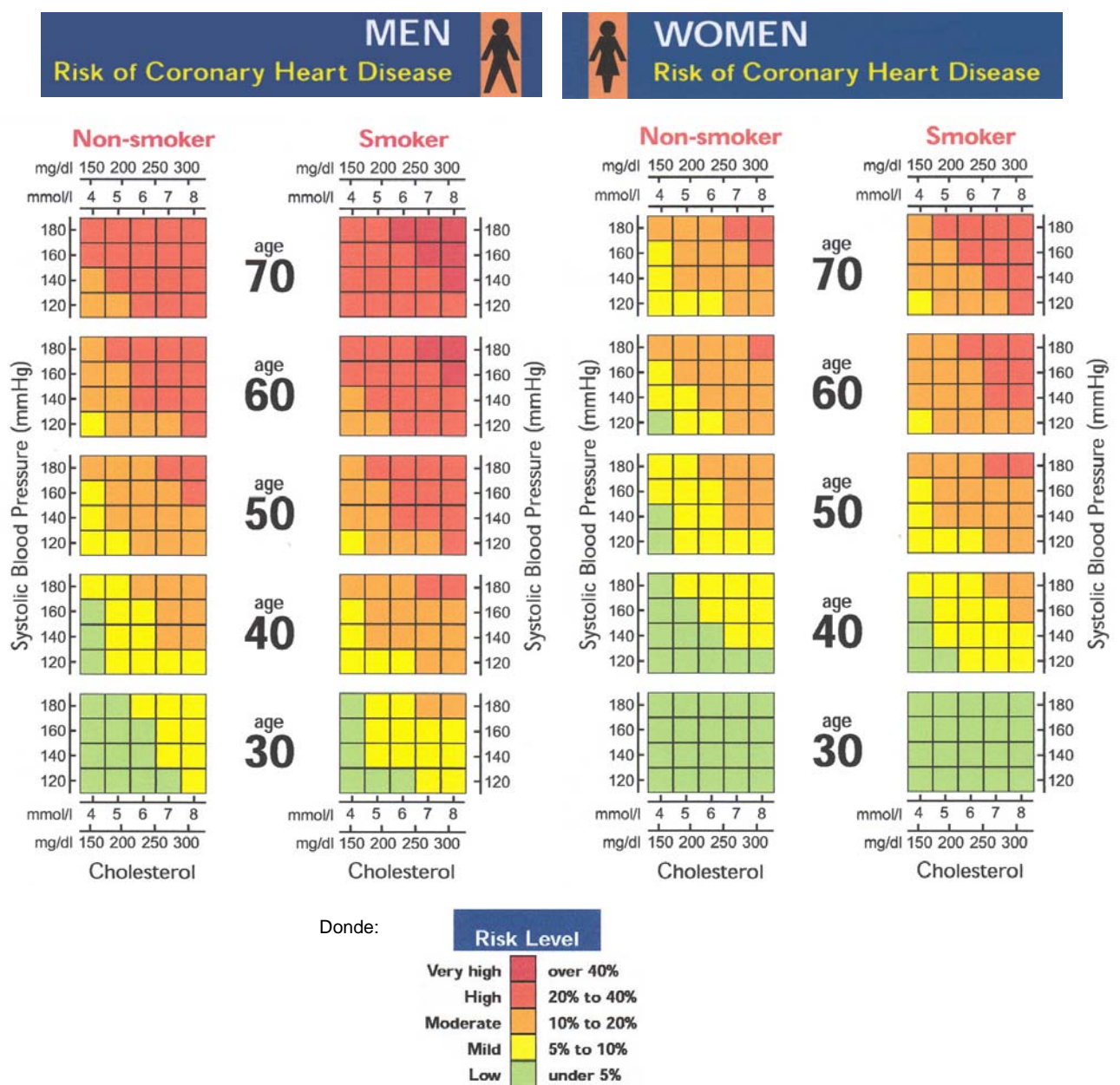
<i>Se considera situación de</i>	<i>Criterio</i>
HIPERCOLESTEROLEMIA	Colesterol > 200 mg/dl
	LDL-colesterol > 115 mg/dl
	HDL-colesterol < 40 mg/dl
HIPERTRIGLICERIDEMIA	Triglicéridos > 180 mg/dl
HIPERGLUCEMIA	Glucosa ayunas: 90-120 mg/dl
	Post prandial: 130-160 mg/dl
HIPERTENSION ARTERIAL	140 / 90 mm Hg
ESTATUS de FUMADOR	nº cigarillos/día: 0 (0)
	nº cigarillos/día: 1-10 (1)
	nº cigarillos: 10-20 (2)
ALCOHOL	Ingesta: <40 g/día (+)
	40-80 g/día (++)
	>80 g/día (+++)

Tabla 4.5-1 Criterios establecidos para considerar determinadas situaciones

Aplicada la carta de riesgo coronario, los individuos participantes en el estudio quedaron clasificados en los siguientes tres grupos, de forma que:

- Grupo 0 (G0): Incluye aquellos sujetos sin ningún factor de riesgo vascular
- Grupo 1 (G1): Incluye los sujetos con factores de riesgo vascular moderado ($\geq 10\%$) y que no presentan enfermedad
- Grupo 2 (G2): Incluye los sujetos con enfermedad aterosclerótica declarada

Figura 4.5-1 Tablas de la Task Force para el cálculo de riesgo vascular³³¹



4.6 ESTUDIO BIOQUÍMICO

Tras doce horas de ayuno, se extrae sangre venosa por punción. El suero obtenido por centrifugación, se alicuota. Una de las alícuotas se envía al laboratorio de Bioquímica con el fin de evaluar factores de riesgo vascular causales y condicionales. Para ello se realiza la medición de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y glucosa en el analizador Roche/Hitachi MODULAR ANALYTICS SWA, Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España.

Otra alícuota se congela a -70°C para posibles comprobaciones y análisis posteriores si fuera necesario.

4.7 MEDICIÓN DE HOMOCISTEÍNA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cuantificación de los niveles de homocisteína total en plasma, se realiza mediante un procedimiento analítico de cromatografía líquida de alta resolución, utilizando reactivos BioRad adaptado y estandarizado en el laboratorio. Las condiciones cromatográficas son:

- Cromatógrafo Kontron (bomba , inyector automático, horno de columna)
- Columna de fase reversa C18 de 70mm x3.2 mm (BioRad: Cat. No. 195-4076)
- Detector fluorescente SF-25, Kontron (Em:385 nm y Ex:515 nm).
- Fase móvil (BioRad: Cat.No. 195-4077), en un sistema isocrático con un flujo de 0.8 ml/min,

La cuantificación de homocisteína total en plasma, requiere liberar previamente la fracción de homocisteína unida a proteínas, lo que se realiza mediante reducción con trialquilfosfina. Se utiliza un método con derivatización precolumna y añadiendo estándar interno.

A 25 μl de calibrador (Cat No 195-4082), controles y plasmas, se añaden 50 μl de estándar interno (Cat.No.195-4084), 25 μl de trialquilfosfina (Cat.No.195-4081) y

25 µl de 4-(aminosulfonil)-7-fluorobenceno-2-oxa-1,3-diazol (ABD-F), como derivatizante (Cat.No.195-4079). Se incuba 5 min a 50°C.

Después de enfriar, se añaden 50 µl de tricloroacético, para precipitación de proteínas y se centrifuga.

20 µl del sobrenadante obtenido se inyectan en el cromatógrafo.

El tiempo de desarrollo del cromatograma es de 5 min. Este sistema es capaz de separar glutatión, cisteína (Cys), homocisteína (Hcy) y el dipéptido cisteína-glicina (Cys-Gly).

El tiempo de retención de la Hcy es de 2.44 min. El estudio de imprecisión incluye controles (BioRad: Cat.No.195-4085) a dos niveles de concentración de tHcy (C1=9.8 y C2=33.0 µmol/L) y se calculan los %CV intra e interanálisis.

Se realiza un test de paralelismo, para el cálculo de la inexactitud, preparando diluciones sucesivas (1:1) con fase móvil a partir del control alto (33.0 µmol/L).

La concentración de tHcy de muestras y controles se calcula según la fórmula:

$$[tHcy]_{\text{muestra}} = \text{Factor } tHcy \times \text{relación área pico (tHcy / IS)}_{\text{muestra}}$$

$$\text{Factor } tHcy = \frac{[Hcy]_{\text{calibrador}} \mu\text{mol/L}}{\text{relación área pico (tHcy / IS)}_{\text{calibrador}}}$$

4.8 MEDICIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA POR ELISA

La cuantificación de los niveles de proteína C reactiva (PCR), se lleva a cabo mediante un enzimoimmunoanálisis sensible tipo “sandwich” (DRG: ref cat EIA-1952), sobre microplaca recubierta con anticuerpo anti-PCR, siguiendo instrucciones del fabricante.

Para ello se prepara una curva de calibración con 5 estándares prediluidos 1/10, en un intervalo de concentración de 1,62-25µg/ml y un blanco de reacción.

En la microplaca se pipetea por duplicado 10 μ L de los estándares previamente diluidos 1:100, así como 10 μ L de las muestras de pacientes diluidas 1:1000. Como control interno del ensayo se incluyen muestras de concentración conocida. Se incuba 30 minutos a T^a ambiente, de forma que la PCR presente en las muestras, queda unida a la placa formando el complejo antígeno-anticuerpo. Tras el lavado de la microplaca para eliminar las proteínas no unidas, el complejo antígeno anticuerpo formado se incuba durante 30 minutos a T^a ambiente, con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.

El conjugado no unido se elimina mediante un segundo lavado de la microplaca y se añade la solución sustrato que contiene tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno, de forma que tras una incubación de 10 minutos a T^a ambiente, se desarrolla color azul, proporcional a la cantidad de inmuno complejo unido. La reacción se para añadiendo H₂SO₄ 2N. La lectura de la absorbancia producida se lleva a cabo a 450nm. El cálculo de la concentración de RCP en las muestras se realiza por interpolación en la curva estándar obtenida, considerando las diluciones realizadas.

4.9 AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

El aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos se realiza mediante un procedimiento de separación en gradiente. El proceso se realiza en condiciones de esterilidad, manipulando las muestras en campana de flujo laminar. Todos los materiales empleados deben ser debidamente tratados para evitar posibles degradaciones debidas a proteasas. Para ello, en tubos de centrifuga estériles (NUNC), se añaden 3,5 mL de PolymorphprepTM (NYCOMED: ref LYS 3702), con una $\sigma = 1,113 \pm 0,001$ g/ml a 20°C, sobre el que se depositan lentamente 5 ml de sangre. La preparación se centrifuga a 450-500 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta centrifugación, los elementos formes de la sangre se separan por gradiente, quedando los eritrocitos en el fondo y, por encima de ellos, dos bandas más claras.

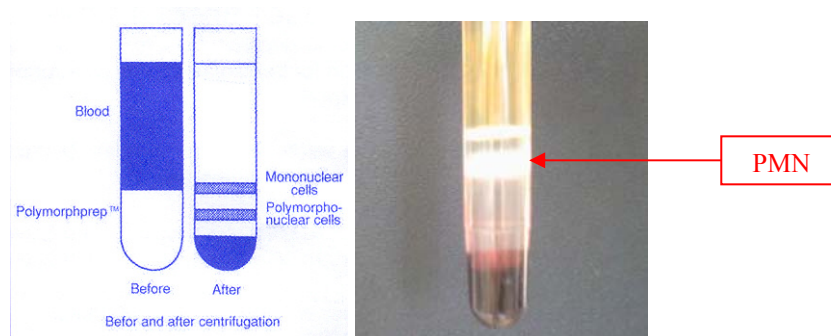


Figura 4.9-1 Ejemplo de extracción de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

La banda inferior corresponde a los PMNs (Fig. 4.9-1), que se recoge y se deposita sobre una solución tampón fosfato PBS, (17.11 mM NaCl , 0.335 mM KCl , $0.44 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $1.016 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ $\text{pH}=7.2$), y se vuelve a centrifugar a 400g durante 5 min . El precipitado obtenido con los PMNs se resuspende en $100 \mu\text{L}$ de tampón de ruptura RIPA ($\text{Tris-HCl } 50\text{mM pH } 7.5$, $\text{NaCl } 150 \text{ mM}$, $\text{Nonidet P40 } 1\%$, $\text{deoxicolato de sodio } 0.5\%$, $\text{SDS } 0.1\%$) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas ($\text{PMSF } 1 \text{ mM}$, $\text{ortovanadato sódico } 1 \text{ mM}$, $\text{leupeptina } 10 \mu\text{g/ml}$, $\text{aprotinina } 10 \mu\text{g/ml}$ y $\text{pepstatina } 10 \mu\text{g/ml}$). Para la obtención de la fracción soluble, los lisados celulares se homogenizan mediante 40 pases de homogenizador Kontes y se centrifugan a 12000 g durante 15 minutos a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Se recoge el sobrenadante y se guarda a -70°C hasta su posterior procesamiento. Para determinar la viabilidad de los PMNs, se emplea el test de exclusión del azul tripán.

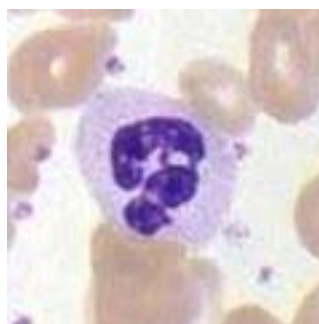


Figura 4.9-2 Ejemplo de extensión de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs)

El contenido en proteínas de la fracción soluble se valora por el método de microensayo de Lowry, utilizando el kit comercial para valoración de proteínas BioRad. La curva de calibración se prepara a partir de una solución de albúmina en un intervalo de 0-10 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de PMNs se diluyen hasta una conseguir una concentración proteica constante de 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$

4.10 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS HSP70 LEUCOCITARIAS y SÉRICAS

La cuantificación de los niveles de Hsp70 leucocitarias y séricas se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis tipo “sandwich” comercial (Stressgen, StressXpress™ EKS-700, Hsp70 ELISA Kit), en microplaca recubierta de anticuerpo monoclonal anti-Hsp70, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se prepara una curva de calibración con 5 puntos, partiendo de un estándar de [Hsp70] = 10 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo un intervalo de 0,78-50 ng/mL , así como un blanco de reacción. Se pipetea por duplicado 100 μL de los estándares, muestras de suero (diluidas 1:5) y muestras de PMNs diluidas a un contenido proteico de 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. La Hsp70 circulante se une al anticuerpo monoclonal formando un complejo que queda fijado a la microplaca. La adición de anticuerpos policlonales de conejo específicos contra estas proteínas y un sustrato de tetrametilbenzidina genera un color azul de intensidad proporcional a la cantidad de Hsp70 de cada muestra. La reacción se para añadiendo H_2SO_4 2N. La intensidad de color producido, se lee a una longitud de onda de 450 nm (referencia 540-570 nm). La concentración de Hsp70 de las muestras, expresada en ng/mL , se obtiene por interpolación en la curva estándar bilogarítmica, de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

4.11 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS *Anti-HSP70* CIRCULANTES

La cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 en suero se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis comercial (Stressgen, StressXpress™, EKS-750, Anti-Human Hsp70 (IgG/IgM/IgA) ELISA Kit), en microplaca recubierta de Hsp70 humana recombinante, capturando los anticuerpos anti-HSP70 presentes en el suero. La detección de los anticuerpos anti-HSP70 capturados, se realiza mediante la adición de un anticuerpo policlonal específico para IgG, IgA y IgM, conjugado con peroxidasa (Anti-Human GAM-HRP Conjugate). El ensayo se desarrolla utilizando un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) que produce un color azul, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HSP70 capturados. El desarrollo del color se para añadiendo solución ácida, lo que da lugar a un color final amarillo.

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se prepara una curva de calibración con 6 puntos, partiendo de un estándar de Anti-HSP70 de concentración 10 µg/mL proporcionado por el fabricante, obteniendo un intervalo de 31,25-1000 ng/mL, así como un blanco de reacción. Se pipetan por duplicado 100 µL de los estándares y muestras de suero (diluidas 1:1000) y se incuba 2 horas a T^a ambiente. Tras un lavado de la microplaca, se añaden 100 µL del anticuerpo policlonal específico de IgA, IgG, IgM conjugado con peroxidasa y se incuba de nuevo 1 hora a T^a ambiente. Se lava y se añaden 100 µL del sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y se incuba durante 15 minutos en oscuridad, y se para la reacción por adición de H₂SO₄ 2N. La medida de la absorbancia producida se realiza a 450 nm (referencia 540-570 nm). La concentración de anticuerpos anti-Hsp70i de las muestras, expresada en µg/mL, se obtiene por interpolación en la curva estándar, de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

4.12 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS *Anti-HSP60* CIRCULANTES

La cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-Hsp60 en suero se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis comercial (Stressgen, StressXpress™ Anti-Human Hsp60 (total) ELISA Kit), en microplaca recubierta de Hsp60 humana recombinante, capturando los anticuerpos anti-HSP60 presentes en el suero. Los anticuerpos anti-Hsp60 capturados, se detectan añadiendo un anticuerpo policlonal específico para IgG, IgA y IgM, conjugado con peroxidasa (Anti-Human GAM-HRP Conjugate). El ensayo se desarrolla utilizando un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) que produce un color azul, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-Hsp60 capturados. El desarrollo del color se para añadiendo ácido, dando un color final amarillo.

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se prepara una curva de calibración con 6 puntos, partiendo de un estándar de anticuerpo Anti-Hsp60 humano proporcionado por el fabricante de concentración 2,5µg/mL, obteniendo un intervalo de 7,81-250 ng/mL. Se prepara un blanco de reacción. Se pipetan por duplicado 100 µL de los estándares y muestras de suero (diluidas 1:1000) y se incuba 2 horas a T^a ambiente. Tras un lavado de la microplaca, se añaden 100 µL del anticuerpo policlonal específico para IgA, IgG, IgM conjugado con peroxidasa y se incuba de nuevo 1 hora a T^a ambiente. Se lava y se añaden 100 µL del sustrato tetrametilbenzidina (TMB), se incuba durante 15 minutos en oscuridad, y se para la reacción por adición de H₂SO₄ 2N. La medida de la absorbancia producida se realiza a 450 nm (referencia 540-570 nm). La concentración de anticuerpos anti-HSP60 de las muestras, expresada en µg/mL, se obtiene por interpolación en la curva estándar, de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

4.13 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE y PMNs

La extracción de ADN se realiza utilizando el Kit comercial “High pure PCR Template Preparation” (Roche. Cat.No. 11796828011), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este reactivo está preparado para la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de material de diferentes muestras. Básicamente se realiza: 1) una lisis celular mediante incubación con proteinasa K y tampón de lisis TL [guanidine-HCl 6M, urea 10mM, Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 20% (v/v), pH 4,4 (25°C)], para inactivar nucleasas, 2) los ácidos nucleicos quedan unidos a la fibra de las columnas proporcionadas, 3) lavado y purificación de las columnas con objeto de eliminar sales, proteínas y otras impurezas celulares y 4) elución de los ácidos nucleicos purificados retenidos en la columna.

En un tubo eppendorff se depositan 200 µL de sangre que se incuban con 40 µL de proteinasa K y 200 µL de tampón TL , durante 10 min a 72°C.

Se añaden 100 µL de isopropanol, se mezcla bien y se transfiere a un tubo con filtro y se centrifuga 1 minuto a 8.000 x g. Se deshecha el filtrado y sobre el contenido de ADN (retenido en el filtro), se añaden 500 µL de tampón inhibidor, [guanidine-HCl 5M, Tris-HCl 20 mM, pH 6,6 (25°C)], preparado con etanol para obtener la concentración final. Se centrifuga 1 minuto a 8.000 x g, procediendo de igual manera a lo descrito anteriormente. Tras 2 lavados del filtrado, éste se centrifuga durante 10 segundos a 13.000 x g para optimizar el rendimiento de la extracción. Finalmente el filtrado se deposita sobre un nuevo tubo eppendorff de 1,5 mL, se añade 200 µL de tampón de elución previamente calentado a 70°C y se centrifuga 1 min a 8.000 x g. El ADN obtenido se congela a – 40°C hasta su uso.

Se procede a la extracción de ADN de los PMNs, aislados y congelados a –70°C, según se describe en el punto 4.9, utilizando el Kit High pure PCR template Preparation (Roche. Cat.No. 11 796 828 011), de acuerdo con el procedimiento descrito en este apartado.

La concentración final de ADN se determina espectrofotométricamente: en una cubeta de cuarzo de 1 ml de volumen, añadir 990 µl de agua y 10 µl de la preparación de ADN genómico.

$$\text{Concentración de ADN (}\mu\text{g / ml)} = \frac{\text{DO}_{260} \times 100 \times 50}{1000}$$

Las muestras se alicuotan y conservan a -80°C .

4.14 ESTUDIO MOLECULAR DEL POLIMORFISMO 677C>T DE LA MTHFR

El polimorfismo involucra el cambio de una citosina (C) por timina (T) en la posición 677 (677C>T), en el exón 4 del gen. Esto se traduce en un cambio de alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína. El estudio molecular se ha realizado por PCR-RFLP y por PCR a tiempo real.

4.14.1 PCR-RFLP

El procedimiento utilizado^{132,335} para la detección del polimorfismo 677C>T, requiere la amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para la MTHFR, sobre el que se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base. El cambio de una base C por T, genera un sitio de restricción para *Hinf* I. El fragmento estudiado tiene una longitud de 209 pb.

Básicamente: 0.5-2.0 µg de ADN genómico se amplifica con 50 ng de los siguientes cebadores:

(*Forward*) C677T (+): 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y

(*Reverse*) C677T (-): 5'AGG-ACG-GTG-CGG-TGA-GAG-TG-3'

La PCR se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ L, preparada con la composición siguiente:

- 5 μ L de tampón TAE 10X (*Tris-HCl* 10 mM, pH 8.3)
- 2.5 μ L Cl_2Mg 50mM,
- 0.4 μ L dNTPs 100mM,
- 0.5 μ L C677T (+),
- 0.5 μ L C677T (-),
- 3.0 μ L ADN,
- 37.2 μ L H_2O desionizada
- 0.5 μ L TAQ Polimerasa (1.25 U)

Las condiciones de PCR en termociclador i-Cycler de BioRad son:

- 1) Desnaturalización inicial a 94°C, 2 min.
- 2) 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 94°C, 30 seg.
 - Anillamiento: 62°C, 30 seg.
 - Extensión: 72°C, 30 seg.
- 3) Extensión final: 72°C, 10 min.
- 4) Final mantenido a 4°C hasta retirar PCR

La digestión del producto de PCR, se lleva a cabo con la enzima de restricción *Hinf* I . La PCR genera un producto de 198 pb, de forma que si existe la mutación tiene un sitio de restricción para *Hinf* I, originándose dos fragmentos de 175 pb y 23 pb.

La electroforesis se realiza sobre gel de agarosa al 4%, y la visualización de las bandas se realiza con bromuro de etidio, identificando las bandas mediante transiluminador de UV.

4.14.2 PCR A TIEMPO REAL

Se realiza una PCR a tiempo real, con el sistema LightCycler (LC) de Roche Applied Science, en un termociclador de alta velocidad, que dispone de una cámara térmica en la que la temperatura de ciclación se alcanza rápidamente ya que el sistema utiliza aire, de forma que se produce una temperatura más homogénea que en un termociclador convencional y se logra una exactitud en la rampa de T^a de $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. El sistema permite variar 20°C / segundo.

La PCR se lleva a cabo en capilares de borosilicato con capacidad para $20\ \mu\text{l}$ de muestra. El protocolo utilizado es el denominado FRET (*Fluorescent Resonance Transfer*), en el que un fluoróforo donante, excitado por luz externa ($\lambda=530\ \text{nm}$), emite luz que es absorbida por un segundo fluoróforo próximo a él (aceptor), el cual emite luz a una longitud de onda diferente del donante ($\lambda=640\ \text{nm}$), siendo el sistema capaz de medir esta luz. El protocolo se basa en la utilización de sondas de hibridación.

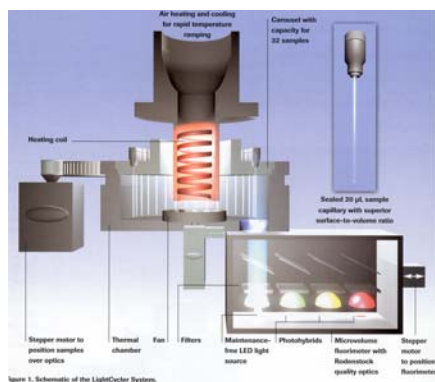


Figura 4.14.2-1 Termociclador

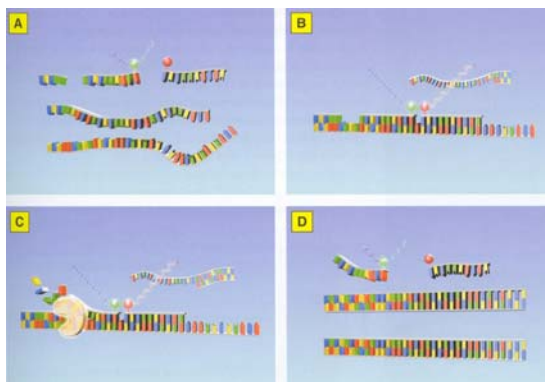


Figura 4.14.2-2

Básicamente, después del anillamiento de los cebadores al ADN desnaturalizado, se realiza la hibridación en el ADN de dos sondas distintas y próximas entre sí, de forma que una esté marcada en su extremo 3' (fluoróforo donante) y la otra esté marcada en su extremo 5' (fluoróforo aceptor), como muestra la figura 4.14.2-2. Una vez excitado el fluoróforo donante, se produce la transferencia de luz, la

excitación del fluoróforo aceptor y la correspondiente emisión de luz que se recoge en un fotodiodo. La emisión de luz será directamente proporcional al número de ciclos de PCR y a la cantidad de ADN. El procedimiento permite monitorizar la amplificación en tiempo real y monitorizar los cambios en la temperatura de fusión de las sondas utilizadas si existe una mutación. Para ello una de las sondas utilizadas debe cubrir la zona en la que se encuentra la mutación. Si no existe mutación la sonda hibrida perfectamente y su temperatura de fusión será más alta que cuando exista la mutación, ya que al existir un desapareamiento la temperatura de fusión del híbrido formado es menor. Todas las reacciones se realizan en el mismo capilar sin necesidad de abrirlo, lo que disminuye el riesgo de contaminación.

El análisis molecular se realiza utilizando la mezcla Roche FastStar^{PLUS} Master, que contiene la Taq polimerasa, Mg²⁺ (Roche Cat:) y el kit LihgtMix[®] human MTHFR C677T (TIB MOLBIOL Cat.-No. 40-0095-16) , que contiene los cebadores y sondas específicas de la mutación 677C>T .

Se amplifica un fragmento de 233 pb y los fragmentos de PCR resultantes se analizan con sondas de hibridación marcadas con LightCycler[®] Red 640. La identificación de los distintos genotipos se realiza mediante el análisis de las curvas de fusión, en referencia a las TM específicas. El genotipo CC (WT) presenta una TM=63,0°C, mientras que el genotipo TT (HM) presenta una TM=54,5°C

Brevemente, cada vial conteniendo las sondas y cebadores liofilizados, para 16 reacciones, se reconstituye con 66 µL de H₂O grado PCR y se mantienen a -20°C hasta su utilización. La tabla 4.14.2-I resume los volúmenes utilizados por cada reacción.

Componente	Volumen(µl)
Agua grado PCR	7,0
Master Mix	4,0
Cebadores y Sondas	4,0
ADN	5,0
Total	20 µl

Tabla 4.14.2-I Componentes y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real

Así, en un tubo eppendorff se prepara el volumen necesario de la mezcla que contiene la Taq polimerasa, Cl_2Mg , cebadores y sondas, completando con H_2O , teniendo un volumen final de 15 μL por muestra, que se depositan en los capilares específicos del sistema LC, mantenidos a T^a de 0-4°C. Sobre la mezcla de reacción, se pipetea 5 μL de ADN de muestras, control positivo (heterocigoto) y control negativo (H_2O), para asegurar que no existan amplificaciones inespecíficas.

La PCR se lleva a cabo en un volumen final de 20 μL , de acuerdo con el siguiente protocolo:

Ciclo del Programa	Desnaturalización
Ciclos	1
Temperatura Objetivo(°C)	95
Tiempo Incubación (seg)	600
RatioTemperaturaTransicion (°C/seg)	20
Modo Adquisición	Ninguno

Ciclo de Programa	PCR- Amplificación		
Ciclos	45		
Modo análisis	Cuantificación		
Temperatura Objetivo	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Temperatura Objetivo (°C)	95	55	72
Tiempo Incubación (seg)	5	10	15
RatioTemperatura Transicion (°C/seg)	20.0	20.0	20.0
Modo Adquisición	None	Simple	None

Programa de Ciclos	Fusión		
Ciclos	1		
Modo de Análisis	Curvas de Fusión (<i>Melting</i>)		
Temperatura Objetivo	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Temperatura Objetivo (°C)	95	40	73
Tiempo Incubación (seg)	20	20	0
RatioTemperatura Transicion (°C/seg)	20	20	0.2
Modo Adquisición	Ninguno	Ninguno	Continuo

Programa de Ciclos	Enfriar
Ciclos	1
Modo Análisis	Ninguno
Temperatura Objetivo (°C)	40
Tiempo Incubation (seg)	30
Ratio Temperatura Transición (°C/seg)	20
Modo de adquisición	Ninguno

El procedimiento de la PCR tiene una duración de 20-30 min. El análisis de las curvas de fusión se realiza tomando la derivada de la fluorescencia con respecto a la

temperatura, lo que permite identificar el genotipo homocigoto normal ó salvaje (*wild type*, WT), en el que se obtiene un solo pico a temperatura de fusión $T_M=63,0^{\circ}\text{C}$, frente al genotipo homocigoto mutado (HM), para el que se obtiene un pico a $T_M= 54,5^{\circ}\text{C}$. En el estado de heterocigoto se obtendrán dos curvas cuya T_M corresponderán con los genotipos WT y HM.

4.15 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN *hsp70i* (*HSPA1A*, NT_007592)

Se estudia la región flanqueante y el promotor del gen que codifica a la proteína de choque térmico 70kDa, perteneciente a la denominada familia 70 de proteínas de choque térmico. Localizado en el cromosoma 6, en la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad, en un cluster relacionado con genes que codifican proteínas similares.

4.15.1 Extracción de ADN de PMNs

Se procede a la extracción de ADN de los PMNs, aislados y congelados a -70°C de acuerdo al punto (4.12), utilizando el Kit *High pure PCR template Preparation* (Roche. Cat.No. 11 796 828 011), de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto (4.9).

La concentración final de ADN se determina espectrofotométricamente: en una cubeta de cuarzo de 1 ml de volumen, añadir 990 μl de agua y 10 μl de la preparación de DNA genómico.

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{\text{DO}_{260} \times 100 \times 50}{1000}$$

Las muestras se alicuotan y conservan a -80°C .

4.15.2 Amplificación de la región reguladora.

Un fragmento de 1053 pb, que comprende el promotor, la región flanqueante 5' del gen *hsp70-1* y parte de la región codificante, se amplifica mediante PCR a partir del ADN genómico aislado de los PMNs de cada uno de los individuos sujetos a estudio. Dada la longitud del fragmento, éste se secuenciaría en dos fragmentos, y después se acoplan las dos subsecuencias obtenidas. Para ello se utilizan cebadores específicamente diseñados a partir de la secuencia publicada (GenBank, NT_007592), tal y como se recogen en la tabla 4.15.2-I, en la que se resumen las secuencias utilizadas y sus propiedades. Los cebadores se han diseñado para conseguir una temperatura de fusión o *melting* (TM) similar, de forma que el contenido de bases de adenina y timina (A+T) y de guanina y citosina (G+C) sea similar en todos los cebadores.

El diseño de los cebadores permite obtener la secuencia completa del promotor, desde el nucleótido situado en posición 22641002 del gen, donde anilla el cebador *forward* 1, hasta el nucleótido en posición 22642055, donde anilla el cebador *reverse* 2D (R2D), de forma que queda comprendida la secuencia flanqueante y parte de la región codificante.

Cebador	Secuencia	Propiedades
F1: <i>FORWARD 1</i>	5' ACTGCACAACCGGGGTCCCC 3' (Confirmado Blast)	G+C: 14 (14*4 = 56) A+T : 6 (6*2 = 12) Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R1: <i>REVERSE 1</i>	5' AGTCGTACGGAGACCCGCC 3' (Confirmado Blast)	G+C: 14 A+T : 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
F2: <i>FORWARD 2</i>	5' GGCGGCACTCTGGCCTCTGA 3' (Confirmado Blast)	G+C : 14 A + T : 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R2C: <i>REVERSE 2C</i>	5' GGCCATGCCGGTCCCTGCT 3' (Confirmado Blast)	G+C: 14 A+T: 6 Temperatura <i>melting</i> (TM): 68° (PCR: Annealing, 64°)
R2D: <i>REVERSE 2D</i>	5' GCCAGTGCTTCATGTCCGAC 3' (Confirmado Blast)	G+C: 12 A+T: 8 Temperatura <i>melting</i> (TM): 64° (PCR: Annealing, 64°)

Tabla 4.15.2-I Características de los cebadores utilizados para el estudio de las secuencias

- Con el cebador F1 se obtiene la secuencia de un fragmento de 483 pb, que alcanza desde el nucleótido en posición 22637357 hasta la posición 22637840 del gen *hsp70* que codifica la HSPA1A.
- Con el cebador R1 se obtiene la secuencia de un fragmento de 340 pb, que alcanza desde el nucleótido en posición 22637807 hasta la posición 22637360 del gen *hsp70* que codifica la HSPA1A.
- Con el cebador F2 se obtiene la secuencia de un fragmento de 321 pb, que alcanza desde el nucleótido en posición 22637778 hasta la posición 22638099 del gen *hsp70* que codifica la HSPA1A.
- Con el cebador R2C se obtiene la secuencia de un fragmento de 320 pb, que alcanza desde el nucleótido en posición 22638035 hasta la posición 22637715 del gen *hsp70* que codifica la HSPA1A.
- Con el cebador R2D se obtiene la secuencia de un fragmento de 1053 pb, que alcanza desde el nucleótido en posición 22641002 hasta la posición 22642055 del gen *hsp70* que codifica la HSPA1A.

La PCR para la amplificación de los fragmentos correspondientes se lleva a cabo en un volumen final de 100 µl, siguiendo las instrucciones del kit High fidelity PCR Master, (Roche, ref 2-140-314), utilizando la “*Master Mix*” (Promega, ref M7502).

Para ello, se pipetea en un tubo eppendorff 50 µl de la mezcla (master mix) que contiene la Taq polimerasa y Cl_2Mg , 1 µl de cada uno de los cebadores, 7,35 µl de ADN (aprox 400ng) y se completa hasta 100 µl con H_2O .

La PCR se lleva a cabo según las condiciones siguientes:

- 1) Desnaturalización inicial: 95°C, 2 min,
- 2) 40 ciclos de:
 - desnaturalización: 94°C, 30 seg;
 - anillamiento: 62°C, 30 seg;
 - extensión: 72°C, 45 seg.
- 3) extensión final 72°C, 7 min,
- 4) final mantenido a 4°C hasta retirar PCR.

El producto amplificado se purifica utilizando el kit de purificación de productos de PCR (Roche): High Pure PCR Product Purification Kit (Ref 1 732 676).

Una vez realizada la PCR, se cuantifican los productos amplificados aplicando una alícuota sobre un gel de agarosa al 0.6%, con patrones de pesos moleculares, que contienen una cantidad conocida de ADN.

4.15.3 Secuenciación de los fragmentos amplificados

La secuenciación automática se realiza en secuenciador de 16 capilares ABI PRISM 3100 en la Unidad de Secuenciación del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón. Se utiliza el método de Sanger³³⁶ de terminación de cadena, que se realiza mediante el kit comercial BigDye Terminator Sequencing (Applied Biosystems).

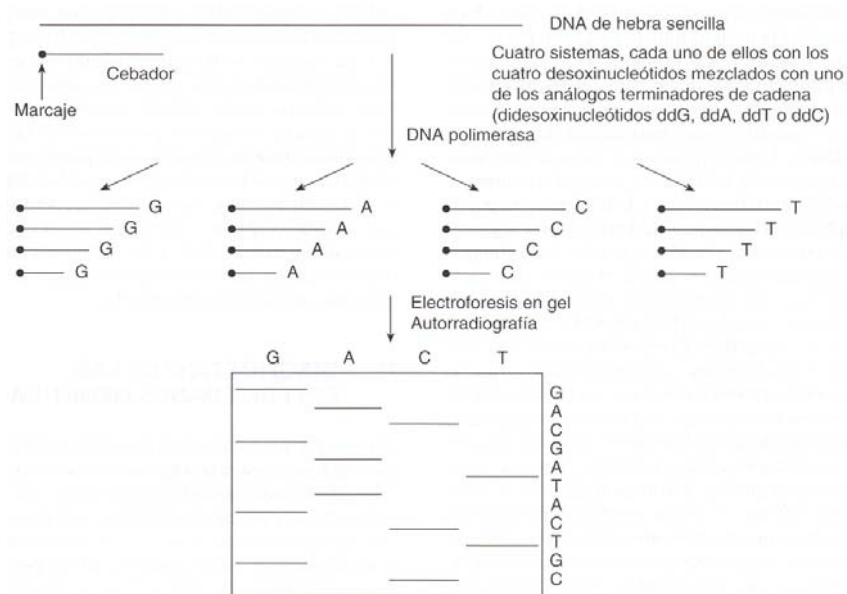


Figura 4.15.3-1 Método de Sanger de secuenciación de ADN. Tomada de González de Buitrago³³⁶

El procedimiento de secuenciación se basa en la realización de 4 incubaciones del fragmento de ADN molde con: Taq polimerasa, cebadores de secuenciación, dNTPs, y los 4 desoxirribonucleósidos trifosfato (cebadores terminadores), marcados con compuestos fluorescentes diferentes, uno de los cuales se introduce en cada sistema

en forma de 2',3'-didesoxirribonucleósido, de forma que la síntesis de la cadena se detiene cada vez que encuentra la base correspondiente, ya que no posee el grupo 3'-OH. La incorporación de la base análoga se realiza al azar, de forma que en cada sistema se produce una mezcla de cadenas marcadas que terminan con el mismo nucleótido. Los cebadores terminadores se marcan con los compuestos que se indican en la tabla.

Terminador	Colorante
A	Dicloro (R6G)
C	Dicloro (ROX)
G	Dicloro (R110)
T	Dicloro (TAMRA)

Los productos obtenidos de las reacciones, se separan mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Con un láser se dirige el rayo hacia un segmento horizontal de la parte inferior del gel, de forma que al pasar los distintos fragmento marcados se excitan y producen fluorescencia. La luz emitida se recoge en un detector con filtros a distintas longitudes de ondas. Cada uno de los nucleótidos se identifican por la fluorescencia asociada a su terminador. El orden de las moléculas fluorescentes, se convierte en una secuencia lineal de ADN y se almacena en un CD para su posterior análisis.

4.15.4 Análisis de la secuencia

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR, se editan utilizando el software específico Chromas 2, adquirido a tal efecto. Este mismo software se usa para ensamblar las secuencias parciales resultantes de cada carrera, lo que permite determinar la secuencia completa del producto amplificado. Las secuencias problema se comparan con la secuencia de la región genómica correspondiente publicada en GenBank (NT_007592) cuyo código de acceso es gi: 51465675. Los resultados de este análisis permiten identificar polimorfismos de un único

nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) de las regiones reguladoras específicas que puedan asociarse a la morbilidad en la población general, en riesgo o afecta de aterosclerosis.

4.16 CÁLCULO DE FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS POLIMORFISMOS

La frecuencia alélica relativa para los polimorfismos estudiados, se obtiene considerando los valores absolutos de los genotipos obtenidos en la población estudiada, dividiendo por el número total de observaciones, aplicando principios de la herencia monogénica. Así la frecuencia relativa de dos alelos N (Normal) y M (Mutado) se calcula:

$$\text{Frecuencia alelo N } (p) = \frac{\text{N}^\circ \text{ Casos N/N} \times 2 + \text{N}^\circ \text{ Casos N/M}}{\text{N}^\circ \text{ Casos Total} \times 2}$$

$$\text{Frecuencia alelo M } (q) = \frac{\text{N}^\circ \text{ Casos M/M} \times 2 + \text{N}^\circ \text{ Casos N/M}}{\text{N}^\circ \text{ Casos Total} \times 2}$$

La probabilidad de que un individuo tenga un genotipo determinado (esperado) en el locus NM, depende de la frecuencia de los alelos N y M, obteniendo la probabilidad para:

$\text{N/N} = p \times p$; $\text{M/M} = q \times q$; $\text{N/M} = (p \times q) + (p \times q)$ de forma que las frecuencias de las tres combinaciones alélicas será: $p^2 + 2pq + q^2$

El hecho de que los genotipos se distribuyan en proporción a las frecuencias de alelos individuales en una población y permanezcan constantes de generación en generación constituye el principio básico de la genética poblacional (Ley de Hardy-Weinberg).

4.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para variables cuantitativas se realiza la comparación de medias para muestras independientes, mediante la prueba T, para un intervalo de confianza del 95%, con un valor de significación de $p < 0,05$. En el caso de existir tres categorías, se lleva a cabo la comparación de medias con la prueba ANOVA de un factor, para comparaciones múltiples “*post hoc*”, con corrección de Bonferroni, para un nivel de significación de $p < 0,05$

Para variables cualitativas o variables cuantitativas con bajo tamaño muestral y dos categorías, se realiza la comparación de medias entre 2 muestras independientes mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Witney, para un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación de 0,05 (bilateral). En el caso de existir tres categorías se lleva a cabo la prueba para varias muestras independientes de H de Kruskal-Wallis.

Se realizan correlaciones bivariadas para variables cuantitativas obteniéndose el coeficiente de correlación de Pearson, con prueba de significación bilateral, con nivel de significación de 0,05 (bilateral).

Para variables cualitativas o cuantitativas de bajo tamaño muestral se realizan correlaciones no paramétricas bivariadas obteniéndose el coeficiente de correlación Rho de Spearman, con prueba de significación bilateral.

Se calcula la razón de prevalencias mediante tablas de contingencia 2x2, obteniendo como estadísticos χ^2 y el exacto de Fischer. Se realizan comparaciones logísticas.

El análisis estadístico de los datos se realiza con el programa SPSS v:12.0 para Windows XP.

4.18 MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

El material bibliográfico se obtuvo mediante consulta de bases de datos de acceso electrónico Proquest, Science Direct, Ovid, Blackwell, obtenidos mediante la búsqueda en PubMed. Última fecha de consulta abril de 2008.

4.19 INFORME DEL RESULTADO

Sobre la base de los acuerdos alcanzados mediante el consentimiento informado, firmado por los participantes en el estudio, en el momento que se disponen de los resultados analíticos, se realiza un informe que se entrega al interesado en sobre cerrado para guardar la confidencialidad.

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO "GREGORIO MARAÑON"			
<i>Registro</i>	7	<i>Grupo</i>	0
<i>Nombre</i>	X	X	X
<i>Fecha Muestra:</i> 04/05/2005			
RESULTADOS			
<i>Estudio</i>		<i>Resultado</i>	
tHcy:		9 umol/L	
MTHFR-C677T:		Heterocigoto	
HSP70 PMN:		20,48 ng/ug proteína	
HSP70i sérica:		0,19 pg/ml	
Anti-HSP70i:		307,33 ug/ml	
RCP:		0,42 ug/ml	
hsp70(-326):		Homocigoto Normal	
hsp70(-27):		Homocigoto Normal	
hsp70 (-97):		Homocigoto Normal	

Figura 4.17-1 Modelo de informe entregado

5.RESULTADOS

5. **RESULTADOS**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos, agrupados en los distintos apartados que se relacionan a continuación:

- 5.1. Análisis descriptivo de la población estudiada. Se recoge: sexo y grupo de riesgo vascular. En tablas y gráficas se muestra la frecuencia y porcentaje de aparición.
- 5.2. Estudio bioquímico. Se presentan los estadísticos descriptivos y la distribución de las variables analizadas, PCR, homocisteína, Hsp70 intracelular y sérica, y anticuerpos circulantes anti-Hsp70 y anti-Hsp60, de acuerdo al siguiente esquema:
 - a) Población global
 - b) Agrupado por sexo. Comparación entre grupos. Prueba T y U-Mann Whitney
 - c) Por grupo de riesgo vascular. Comparación entre grupos. Prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA con análisis “post hoc” de Bonferroni de comparación de medias para muestras independientes
- 5.3. Estudio de la relación entre proteínas de choque térmico, homocisteína y PCR. Se realiza correlación bivariada y se obtiene el coeficiente Rho de Spearman. Las tablas recogen solo aquellas correlaciones que alcanzan nivel de significación estadística, así como las que se consideran de relevancia clínica.
- 5.4. Estudio molecular del polimorfismo 677C>T del gen que codifica la MTHFR. Se presenta, según el esquema anterior, la frecuencia de aparición y la distribución del polimorfismo.
- 5.5. Influencia del polimorfismo 677C>T en los niveles plasmáticos de homocisteína. Se presentan la posible influencia del polimorfismo, siguiendo el mismo esquema de agrupación.
- 5.6. Influencia del polimorfismo 677C>T sobre proteínas de choque térmico y anticuerpos anti-Hsps. Se presentan la posible influencia del polimorfismo, siguiendo el mismo esquema de agrupación.
- 5.7. Estudio molecular de los polimorfismos de la región reguladora del gen *hsp70*.
- 5.8. Influencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70* en los niveles de Hsps, tHcy y RCP
- 5.9. Influencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70* en la relación entre Hsps, tHcy y RCP
- 5.10. Relación entre Hsps y anticuerpos anti-Hsps en la aterosclerosis

- 5.11. Clasificación de individuos de acuerdo a la expresión de Hsp70. Se obtienen los percentiles P_{25} , P_{50} y P_{75} .

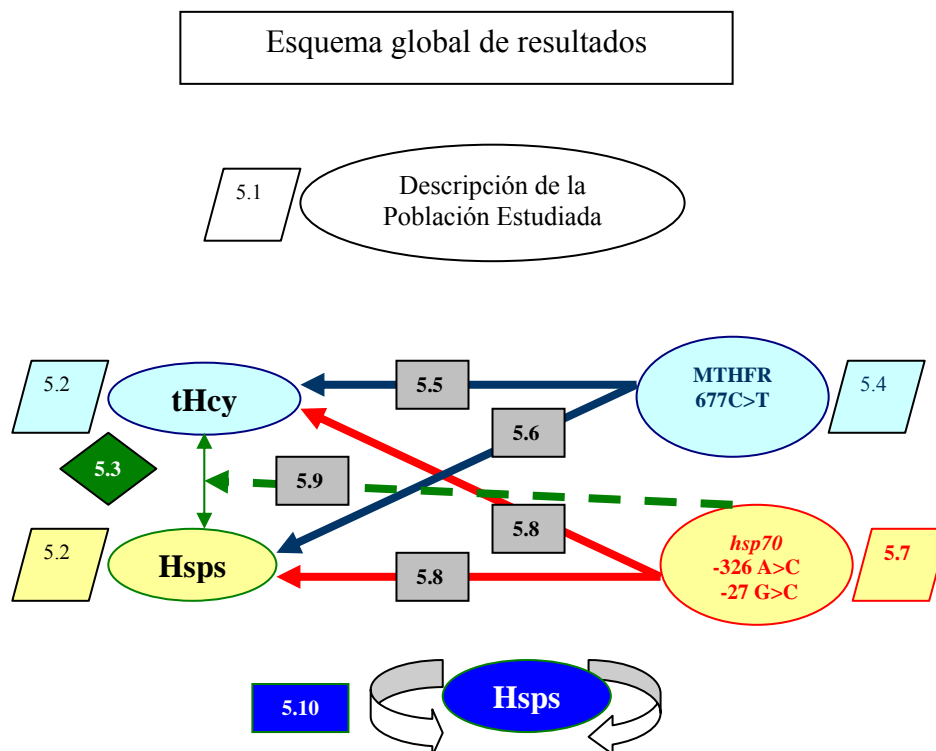


Figura 5-1 Esquema de los resultados obtenidos

5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

➤ DISTRIBUCIÓN POR SEXO

Se incluye en el estudio una muestra de 115 sujetos, con una edad media de $48,57 \pm 6,77$ ($x \pm SD$) años, seleccionados de forma aleatoria y estratificada por sexo, tal y como se describe en el apartado 4.1, cuya frecuencia y distribución se recoge en la tabla 5.1-I y figura 5.1-1, en donde se observa que no existen diferencias significativas para la variable edad entre ambos grupos ($p=0,523$)

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Edad	s
mujer	58	50,4	49,12	6,30
varón	57	49,6	48,00	7,22
Total	115	100,0		

Tabla 5.1-I Frecuencia por sexo y edad de la población analizada

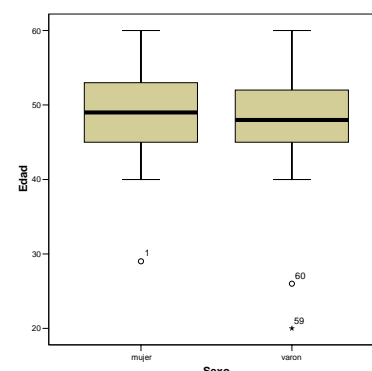


Figura 5.1-1 Distribución de la edad, por sexo

➤ DISTRIBUCIÓN POR GRUPO DE RIESGO VASCULAR

Tras aplicar la carta de riesgo coronario *Task Force* (ver 4.5), los sujetos participantes en el estudio, quedaron distribuidos de la siguiente manera, tal y como se recoge en las tablas 5.1-II y 5.1-III.

- En el G0, sin factores de riesgo vascular (NO FRV), se incluyen un total de 76 individuos, de los que 44 (57.9%) son mujeres y 32 (42.1%) varones.
- En el grupo G1, con factores de riesgo moderado (FRV Moderado), se incluyen un total de 29 sujetos, 9 de ellos mujeres (31.0%) y 20 varones (69.0%),
- En el grupo G2, con enfermedad declarada, quedaron incluidos 10 personas, 5 mujeres y 5 varones.

Grupo de Riesgo	Frecuencia	Porcentaje
G0 NO FRV	76	66,1
G1 FRV MODERADO	29	25,2
G2 ENFERMEDAD	10	8,7
Total	115	100,0

Tabla 5.1-II Frecuencia de casos por grupo de riesgo vascular, en la población analizada

La tabla 5.1-III y figura 5.1-1, recogen las frecuencias y distribución encontradas al agrupar por grupo de riesgo y sexo. Las diferencias de frecuencias con respecto al sexo encontradas entre los G0 y G1, son estadísticamente significativas ($p=0,042$), de forma que las mujeres se clasifican mayoritariamente en el grupo G0.

	Grupo de Riesgo	Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Edad	s
G0	NO FRV	mujer	44	57,9	48,64	5,4
		varón	32	42,1	46,03	4,1
		Total	76	100,0		
G1	FRV MODERADO	mujer	9	31,0	51,78	5,8
		varón	20	69,0	49,60	10,2
		Total	29	100,0		
G2	ENFERMEDAD	mujer	5	50,0	48,60	12,8
		varón	5	50,0	54,20	2,68
		Total	10	100,0		

Tabla 5.1-III Frecuencia de casos por grupo de riesgo vascular y edad, agrupado por sexo

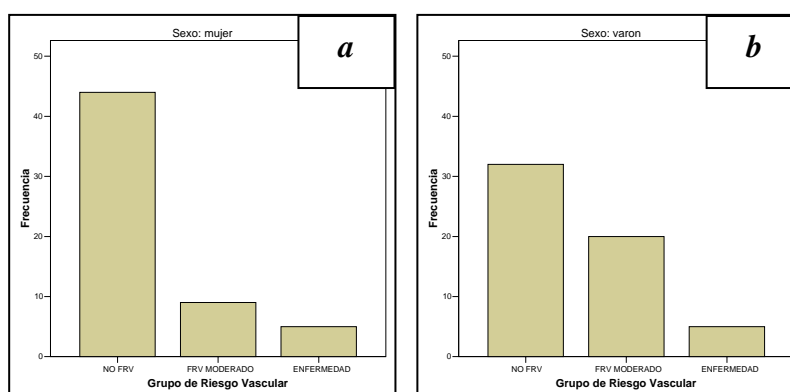


Figura 5.1-1 Distribución por grupo de riesgo vascular de la población analizada. (a) Sexo: mujer, (b) Sexo: varón,

Los 5 pacientes y los 4 sujetos miembros de la familia incluidos en el estudio (ver 4.1), quedaron clasificados de la siguiente forma: 6 de ellos (4 mujeres y 2 varones) se incluyeron G2, mientras que los 3 restantes (1 mujer, 2 varones) quedaron incluidos en el G1.

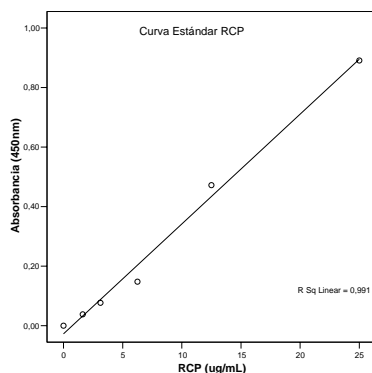
5.2 ESTUDIO BIOQUÍMICO. VARIABLES ANALIZADAS (objetivo 3.1)

➤ PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medida de PCR, expresada en $\mu\text{g/mL}$, se resumen a continuación:

Intervalo de medición (Linealidad)	1-25	
Límite de detección ([] mínima medible)	1	
	Nivel I (5,2)	Nivel II (48,3)
Imprecisión intraserie (%CV)	5,1	6,8
Imprecisión interserial (%CV)	14,3	11,6
Valores de referencia	$P_{95} = 5$	

Tabla 5.2-I. Características analíticas



Los resultados se obtienen por interpolación en la curva de calibración procesada en todos los ensayos.

Figura 5.2-1 Curva Estándar obtenida en los ensayos para PCR

a) Población Global

PCR ($\mu\text{g/mL}$)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población Global	115	,01	52,22	4,52	7,76	3,372	0,000**

Tabla 5.2-II Estadística descriptiva de la concentración de PCR obtenida en la población analizada

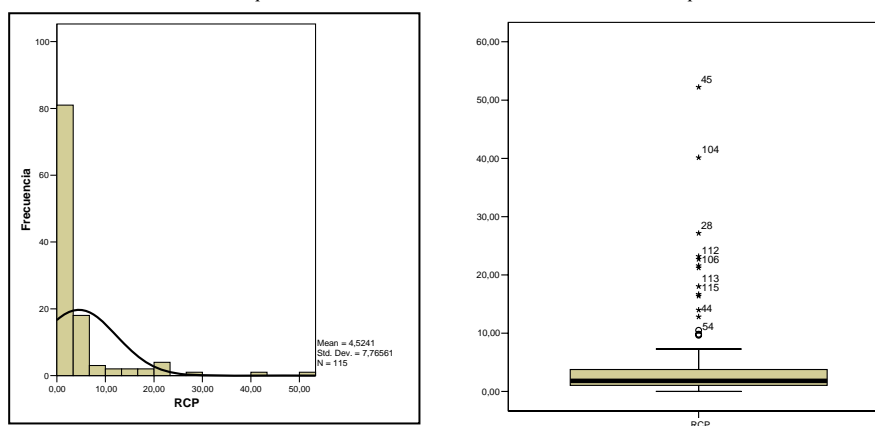


Figura 5.2-2 Distribución de los valores de PCR obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de PCR obtenidos, NO se ajustan a una distribución normal ($Z=3.372$, $p=0.000$), presentando una concentración media de $4,52 \mu\text{g/mL}$.

b) Agrupado por Sexo

PCR (µg/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo mujer	58	,01	52,22	4,26	8,090	2,444	0,000**
varón	57	,10	40,14	4,78	7,482	2,382	0,000**

Tabla 5.2-III Estadística descriptiva de los valores de PCR obtenida en la población analizada, agrupada por sexo

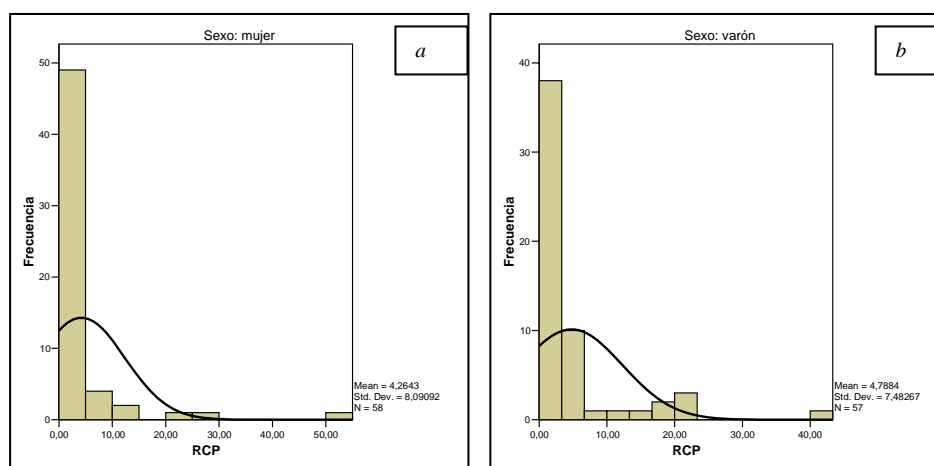
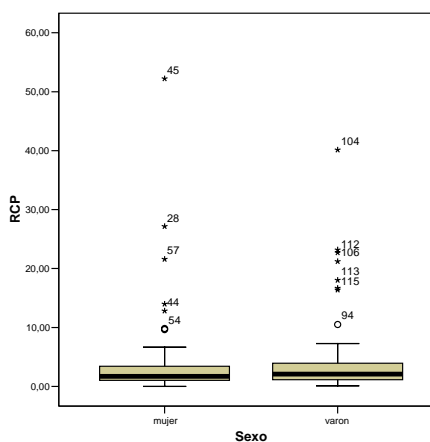


Figura 5.2-3 Distribución de los valores de PCR obtenida en la población analizada. (a) Sexo: mujer, (b) Sexo: varón

	PCR
U de Mann-Whitney	1544,000
W de Wilcoxon	3255,000
Z	-,610
Sig. asintót. (bilateral)	,542

Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	,189	,664	-,360	113	,719	-,52411	1,45391
No se han asumido varianzas iguales			-,361	112,588	,719	-,52411	1,45291

No se observan diferencias significativas para los niveles de PCR entre ambas poblaciones.

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

PCR ($\mu\text{g/mL}$)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0 NO FRV	76	,01	13,99	2,09	2,20	1,691	0,007**
G1 FRV MODERADO	29	,26	52,22	7,41	11,05	1,654	0,008**
G2 ENFERMEDAD	10	1,17	40,14	14,58	12,41	0,588	0,879

Tabla 5.2-IV Media de la concentración de PCR obtenida en la población analizada, por grupo de riesgo vascular

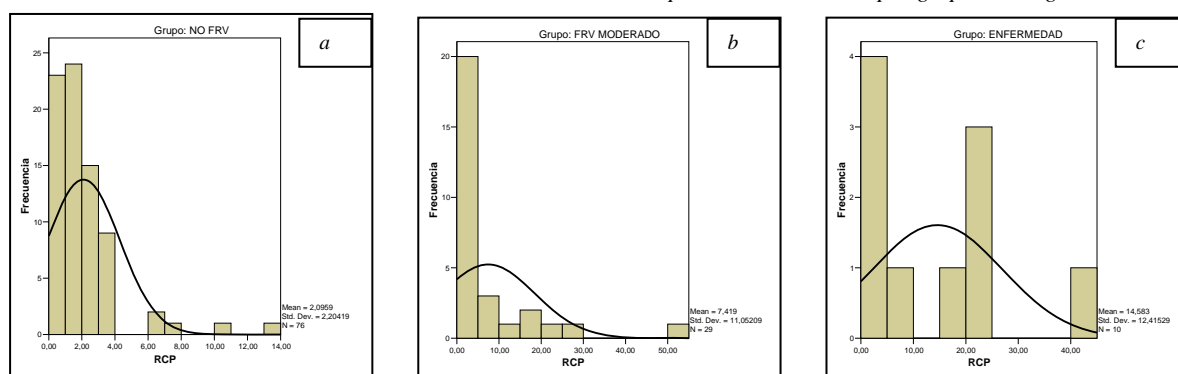
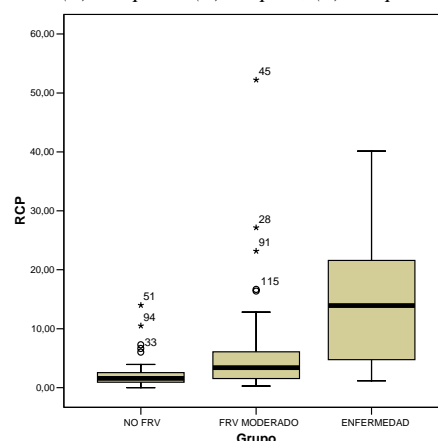


Figura 5.2-4. Distribución de los valores de PCR en la población analizada. (a) Grupo 0, (b) Grupo 1, (c) Grupo 2

Kruskal-Wallis	PCR
Chi-cuadrado	22,623
Gl	2
Sig. asintót.	,000

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1702,942	2	851,471	18,439	,005
Intra-grupos	5171,799	112	46,177		
Total	6874,741	114			



Comparaciones múltiples		Variable dependiente: PCR.		Bonferroni		
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	-5,32304(*)	1,48320	,001	-8,9279	-1,7182
	G2=ENFERMEDAD	-12,48708(*)	2,28588	,000	-18,0429	-6,9313
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	5,32304(*)	1,48320	,001	1,7182	8,9279
	G2=ENFERMEDAD	-7,16403(*)	2,49198	,015	-13,2207	-1,1073
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	12,48708(*)	2,28588	,000	6,9313	18,0429
	G1=FRV MODERADO	7,16403(*)	2,49198	,015	1,1073	13,2207

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0.05

La prueba KRUSKAL-WALLIS arroja diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,000$). La U de Mann-Whitney muestra diferencias entre G0:G1 ($p=0,001$), G0:G2 ($p=0,000$) y G1:G2 ($p=0,047$). La prueba ANOVA y el análisis de Bonferroni confirma las diferencias encontradas entre los grupos G0:G1 ($p=0,001$), G0:G2 ($p=0,000$) y G1:G2 ($p=0,015$)

➤ HOMOCISTEÍNA

Las características analíticas del procedimiento utilizado, para la medición de homocisteína total expresada en $\mu\text{mol/L}$, se resumen a continuación:

Intervalo de medición (Linealidad)	1,2-40	
Límite de detección ([] mínima medible)	1,2	
	Nivel I (9,8)	Nivel II (38,5)
Imprecisión intraserie (%CV)	6,7	4,2
Imprecisión interserial (%CV)	8,6	7,5
Valores de referencia	Hombres	Mujeres
	P ₉₅ =14	P ₉₅ =11

Tabla 5.2-V Características analíticas

El tiempo de desarrollo del cromatograma es de 5 min. Este sistema es capaz de separar glutatión, cisteína (Cys), estándar interno (IS), homocisteína total (tHcy) y el dipéptido cisteína-glicina (Cys-Gly). El tiempo de retención de la Hcy es de 2.44 min. Para el estudio de inexactitud, se realizó un test de paralelismo, haciendo diluciones sucesivas (1:1) con fase móvil del control alto (38,5 mmol/L).

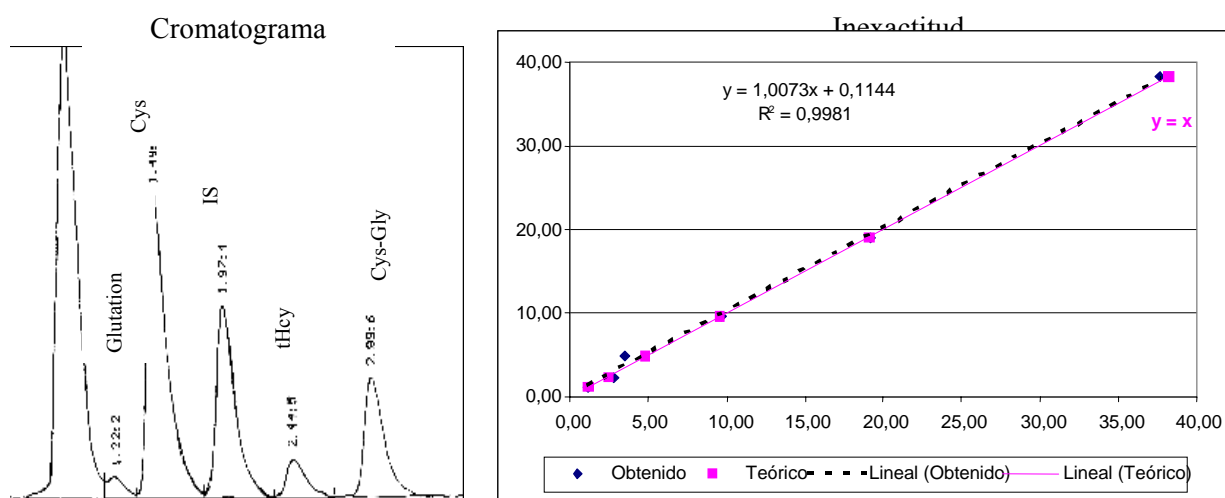


Figura 5.2-5 a) Separación de tHcy. Cromatograma obtenido por HPLC. b) Estudio de inexactitud del procedimiento analítico

Para establecer los valores de referencia en nuestro laboratorio, se recogió muestra de sangre de forma anónima no relacionable, de un grupo control de 107 donantes sanos (53 varones y 54 mujeres), con un rango de edad comprendido entre 18 y 64 años.

Hcy (HPLC)	Sexo	N	Mín.	Máx.	Media	Mediana	s	Z de K-S	P ₉₅
	Mujer	54	2,78	16,86	6,36	5.68	2,36	1,466	11.10
	Varón	53	4,08	18,95	8,27	8.10	2,91	1,737	13.37

Tabla 5.2-VI Estadística descriptiva de la concentración de homocisteína obtenida en la población de donantes sanos para establecer valores de referencia

El test de ajuste a la normalidad de Kolmogorov-Smirnov demuestra que la tHcy no se ajusta a una distribución normal en ninguno de los grupos. El valor de tHcy, por encima del cual se considera situación de hiperhomocisteinemia, quedó establecido como percentil 95, para cada grupo, siendo de [tHcy]=11 $\mu\text{mol/L}$ para mujeres y [tHcy]=13 $\mu\text{mol/L}$ para varones.

a) Población Global

Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global	115	4	36	8,46	3,669	1,753	0,004*

Tabla 5.2-VII Estadística descriptiva de la concentración de homocisteína obtenida en la población analizada

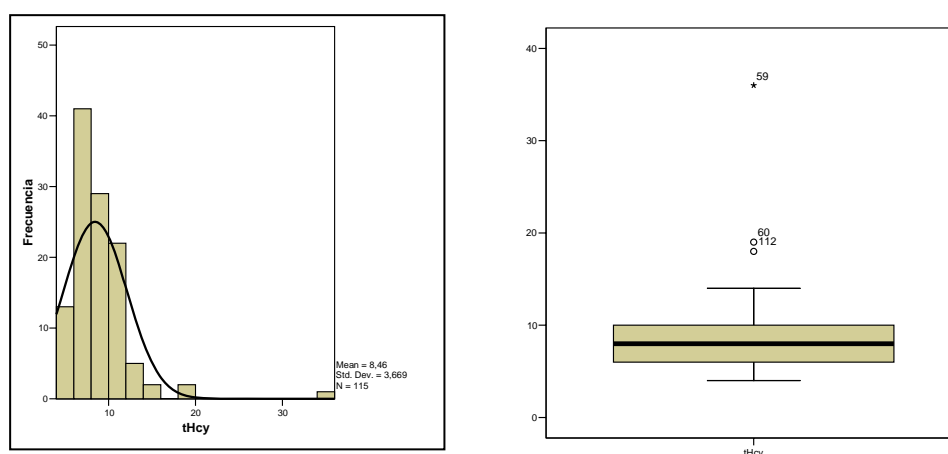


Figura 5.2-5 Distribución de los valores de homocisteína obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de homocisteína obtenidos NO se ajustan a una distribución normal ($Z=1.753$, $p=0.004$), presentando una concentración media de 8,46 $\mu\text{mol/L}$.

b) Agrupado por Sexo

Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo	mujer	58	4	13	7,72	2,25	1,485	0,024*
	varón	57	5	36	9,21	4,59	1,703	0,006*

Tabla 5.2-VIII Estadística descriptiva de los valores de homocisteína obtenida en la población analizada, por sexo

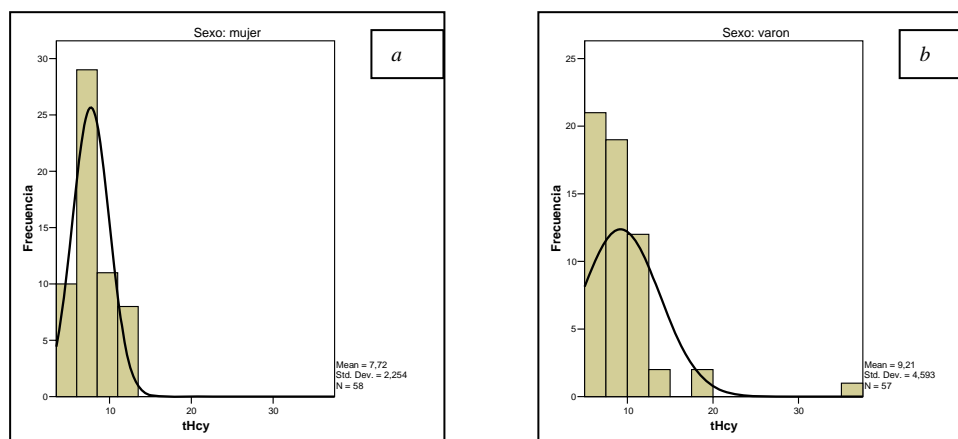
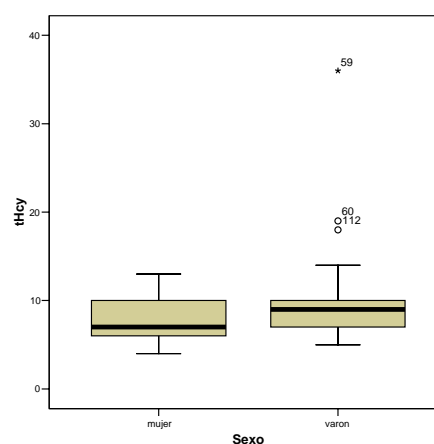


Figura 5.2-6 Distribución de los valores de homocisteína en la población analizada. (a) Sexo: mujer, (b) Sexo: varón

	tHcy
U de Mann-Whitney	1310,500
W de Wilcoxon	3021,500
Z	-1,934
Sig. asintót. (bilateral)	,053

Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	1,875	,174	-2,209	113	,029	-1,486	,673
No se han asumido varianzas iguales			-2,197	81,175	,031	-1,486	,677

Existen diferencias significativas para los niveles de homocisteína entre ambas poblaciones, con un nivel de significación de $p=0,053$ y que se confirma con la prueba T de comparación de medias ($p=0,029$).

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Homocisteína (μmol/L)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0	NO FRV	76	4	12	7,68	1,98	1,518	0,020*
G1	FRV MODERADO	29	4	36	9,76	5,87	1,499	0,022*
G2	ENFERMEDAD	10	6	18	10,60	3,80	0,515	0,953

Tabla 5.2-IX Media de la concentración de tHcy obtenida en la población analizada, por grupo de riesgo vascular

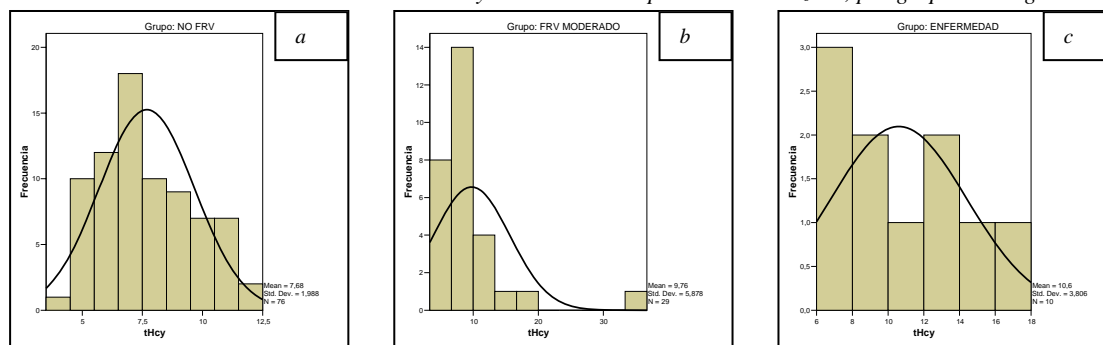
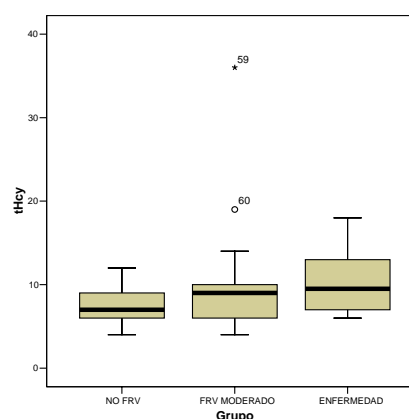


Figura 5.2-7 Distribución de valores de tHcy obtenida en la población analizada. (a) Grupo 0, (b) Grupo 1, (c) Grupo 2

Kruskal-Wallis	tHcy
Chi-cuadrado	8,209
Gl	2
Sig. asintót.	,016

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	140,443	2	70,221	5,641	,005
Intra-grupos	1394,131	112	12,448		
Total	1534,574	114			



Comparaciones múltiples		Variable dependiente: tHcy		Bonferroni		
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	-2,074(*)	,770	,024	-3,95	-,20
	G2=ENFERMEDAD	-2,916(*)	1,187	,047	-5,80	-,03
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	2,074(*)	,770	,024	,20	3,95
	G2=ENFERMEDAD	-,841	1,294	1,000	-3,99	2,30
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	2,916(*)	1,187	,047	,03	5,80
	G1=FRV MODERADO	,841	1,294	1,000	-2,30	3,99

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

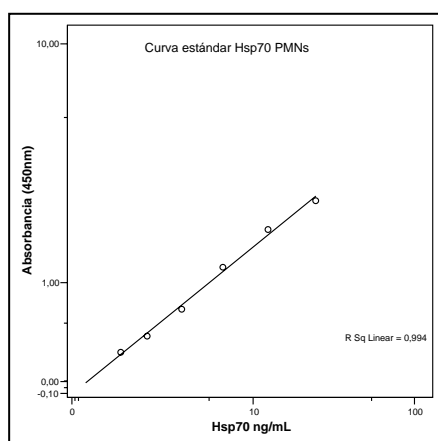
La prueba KRUSKAL-WALLIS arroja diferencias estadísticamente significativas entre grupos con nivel de significación ($p=0,016$). La prueba de Mann-Whitney demuestra las diferencias entre los grupos G0:G1 ($p=0,056$) y G0:G2 ($p=0,014$). El análisis de Bonferroni lo confirma ($p=0,024$ y $p=0,047$).

➤ Hsp70i EN POLIMORFONUCLEARES

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medición de Hsp70i leucocitarias, expresadas en ng/mL, se resumen a continuación:

Intervalo de medición (Linealidad)	0,78-50
Límite de detección ([] mínima medible)	0,40
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	0-64

Tabla 5.2-X Características analíticas



Los resultados se obtienen por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados, expresado en ng/ μ g de proteína, cuantificada por Lowry.

Figura 5.2-8 Curva estándar obtenida en los ensayos para Hsp70i en PMNs

a) Población Global

Hsp70i PMN (ng/ μ g proteína)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población global	115	2,62	160,75	31,39	21,63	1,066	0,206

Tabla 5.2-XI Estadística descriptiva de la concentración de Hsp70i obtenida en la población analizada

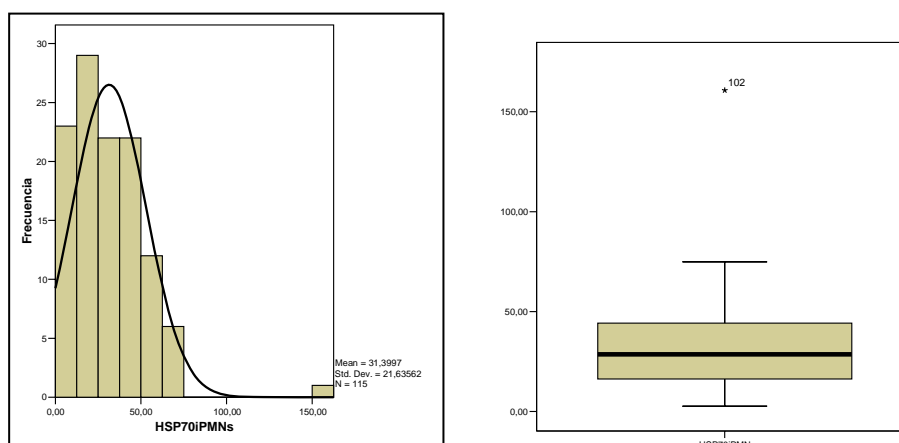


Figura 5.2-42 Distribución de los valores de Hsp70i obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de Hsp70i en PMNs obtenidos se ajustan a una distribución normal ($Z=1.066$, $p=0.206$), presentando una concentración media de 31,39 ng/ μ g proteína.

b) Agrupado por sexo

Hsp70i PMN (ng/μg proteína)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo	mujer	58	4,64	74,91	32,33	18,96	0,741	0,642
	varón	57	2,62	160,75	30,44	24,18	1,022	0,248

Tabla 5.2-XII Estadística descriptiva de los valores de Hsp70i obtenida en la población analizada, agrupada por sexo

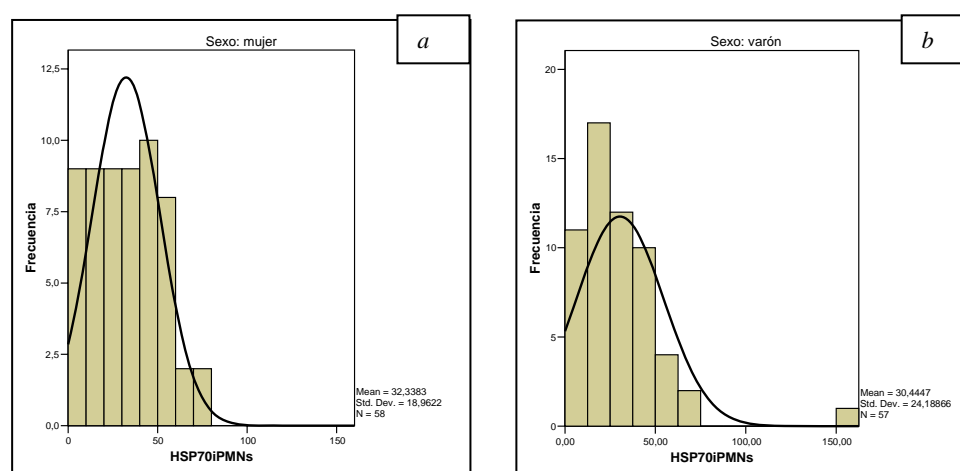
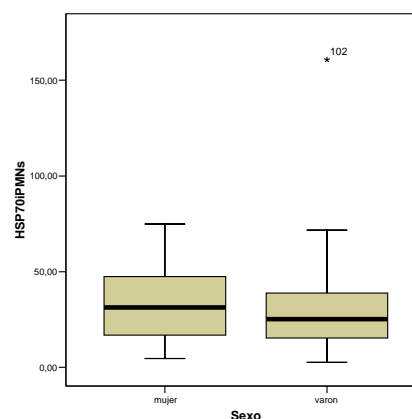


Figura 5.2-9 Distribución de los valores de Hsp70i obtenida en la población analizada. (a) Sexo: mujer, (b) Sexo: varón

	Hsp70iPMN
U de Mann-Whitney	1477,500
W de Wilcoxon	3130,500
Z	-,982
Sig. asintót. (bilateral)	,326

Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	,006	,941	,468	113	,641	1,89359	4,04911
No se han asumido varianzas iguales			,467	106,061	,642	1,89359	4,05760

Aunque no existen diferencias significativas para los niveles de Hsp70i en PMN entre ambas poblaciones ($p=0,641$), las mujeres presentan niveles más altos que los varones.

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Hsp70i PMN (ng/ μ g proteína)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0 NO FRV	76	2,62	74,63	29,68	17,59	0,812	0,524
G1 FRV MODERADO	29	5,67	160,75	36,43	31,37	0,914	0,373
G2 ENFERMEDAD	10	7,92	54,28	29,82	13,32	0,504	0,961

Tabla 5.2-XIII Media de la concentración de Hsp70i obtenida en la población analizada, por grupo de riesgo vascular

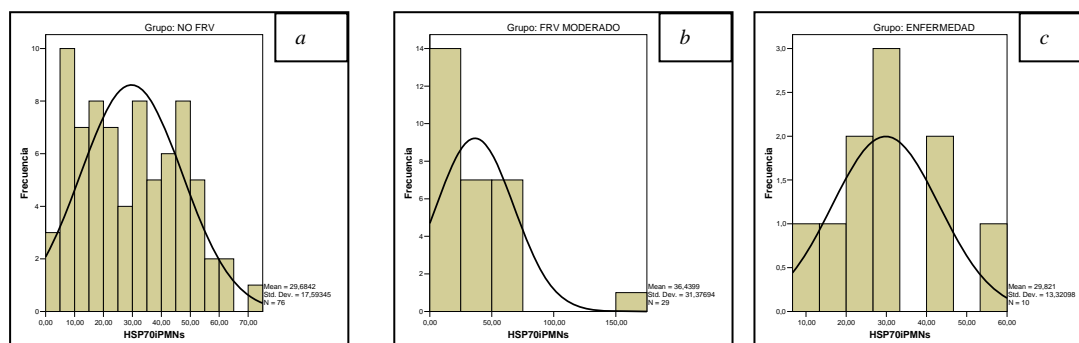
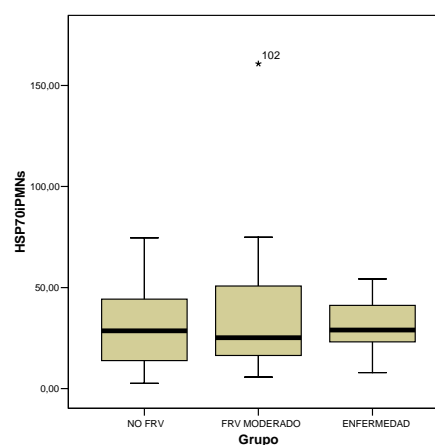


Figura 5.2-10 Distribución de los valores Hsp70i por grupo riesgo vascular. Donde:(a) Grupo 0, (b) Grupo 1, (c) Grupo 2

Kruskal-Wallis	Hsp70i PMN
Chi-cuadrado	,371
Gl	2
Sig. asintót.	,831

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	985,288	2	492,644	1,053	,352
Intra-grupos	52378,098	112	467,662		
Total	53363,385	114			



Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Hsp70i PMN

Bonferroni

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	-6,75569	4,72014	,465	-18,2278	4,7165
	G2=ENFERMEDAD	-,13679	7,27459	1,000	-17,8174	17,5439
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	6,75569	4,72014	,465	-4,7165	18,2278
	G2=ENFERMEDAD	6,61890	7,93047	1,000	-12,6559	25,8937
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	,13679	7,27459	1,000	-17,5439	17,8174
	G1=FRV MODERADO	-6,61890	7,93047	1,000	-25,8937	12,6559

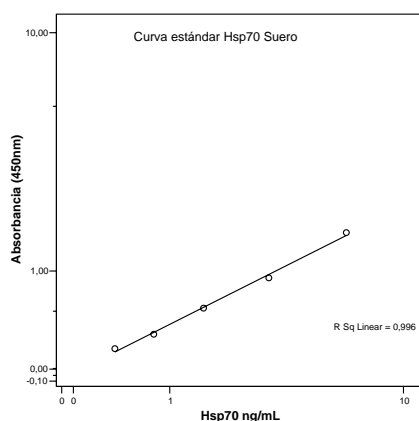
El grupo de riesgo vascular G1, presenta los niveles más elevados de Hsp70 intraleucocitarios. La prueba de KRUSKAL-WALLIS demuestra que no existen diferencias significativas entre los grupos. La prueba de ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirma.

➤ Hsp70i EN SUERO

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medición de las HSP séricas, expresadas en ng/mL, se resumen a continuación:

Intervalo de medición (Linealidad)	0,34-6,25
Límite de detección ([] mínima medible)	0,30
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	P ₉₅ = 3,63

Tabla 5.2-XIV Características analíticas



Los resultados se obtienen por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados

Figura 5.2-11 Curva estándar obtenida en los ensayos para Hsp70i en suero

a) Población Global

Hsp70i (ng/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población Global	115	,19	7,54	1,65	1,04	1,612	0,011*

Tabla 5.2-XV Estadística descriptiva de la concentración de-Hsp70i sérica obtenida en la población analizada

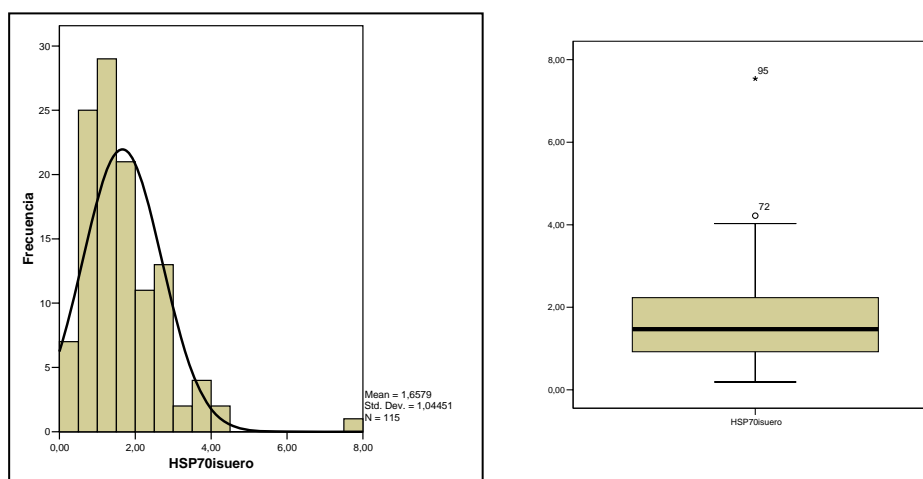


Figura 5.2-12 Distribución de los valores de HSP70i sérica obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de Hsp70i en PMN obtenidos NO se ajustan a una distribución normal (Z=1.612, p=0.011), presentando una concentración media de 1,65 ng/mL.

b) Agrupado por Sexo

Hsp70i (ng/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo mujer	58	,19	4,03	1,56	0,91	1,036	0,233
varón	57	,33	7,54	1,75	1,16	1,378	0,045*

Tabla 5.2-XVI Estadística descriptiva de los valores de Hsp70i sérica, agrupada por sexo

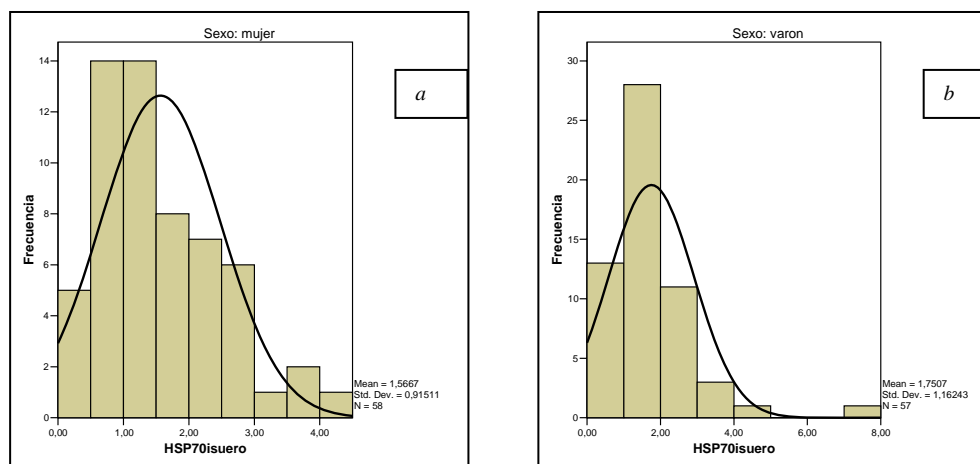
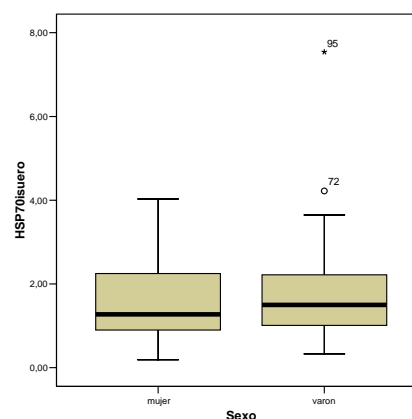


Figura 5.2-13 Distribución de los valores de Hsp70i sérica, agrupada por sexo. Donde: (a) mujer, (b) varón

	Hsp70i suero
U de Mann-Whitney	1507,500
W de Wilcoxon	3218,500
Z	-,814
Sig. asintót. (bilateral)	,416

a Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	,150	,699	-,944	113	,347	-,18398	,19490
No se han asumido varianzas iguales			-,942	106,262	,348	-,18398	,19531

Aunque no existen diferencias significativas para los niveles de Hsp70i circulantes, entre ambas poblaciones ($p=0,347$), los varones presentan niveles más altos que las mujeres.

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Hsp70i (ng/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0 NO FRV	76	,19	4,22	1,60	0,92	1,192	0,117
G1 FRV MODERADO	29	,57	7,54	1,70	1,39	1,379	0,045*
G2 ENFERMEDAD	10	,31	2,73	1,42	0,76	0,495	0,967

Tabla 5.2-XVII Media de la concentración de Hsp70i obtenida en la población analizada, por grupo de riesgo vascular

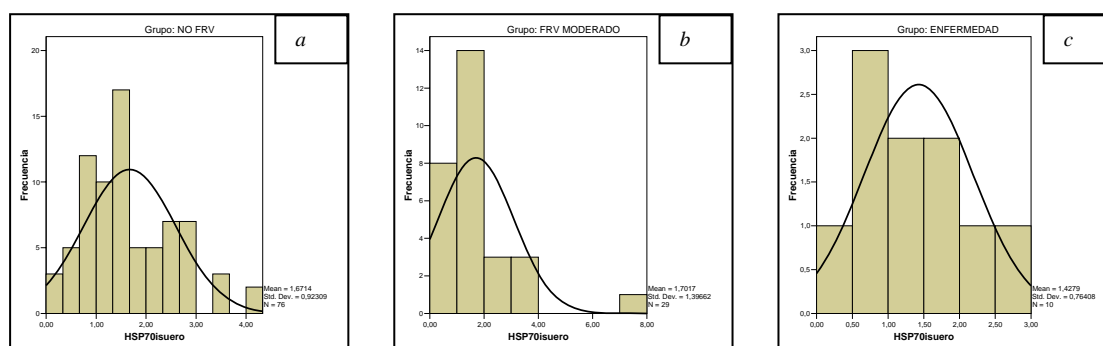
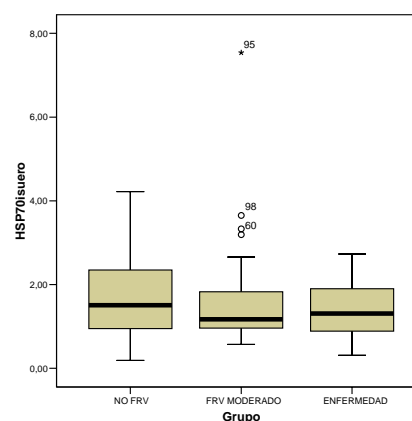


Figura 5.2-14 Distribución de Hsp70i sérica, por grupo de riesgo vascular. Donde: (a) Grupo 0, (b) Grupo 1, (c) Grupo 2

Kruskal-Wallis	Hsp70i suero
Chi-cuadrado	1,124
Gl	2
Sig. asintót.	,570

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,599	2	,299	,271	,763
Intra-grupos	123,776	112	1,105		
Total	124,375	114			



Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Hsp70i suero

Bonferroni

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	-,03024	,22946	1,000	-,5879	,5274
	G2=ENFERMEDAD	,24355	,35363	1,000	-,6159	1,1030
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	,03024	,22946	1,000	-,5274	,5879
	G2=ENFERMEDAD	,27379	,38552	1,000	-,6632	1,2108
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	-,24355	,35363	1,000	-1,1030	,6159
	G1=FRV MODERADO	-,27379	,38552	1,000	-1,2108	,6632

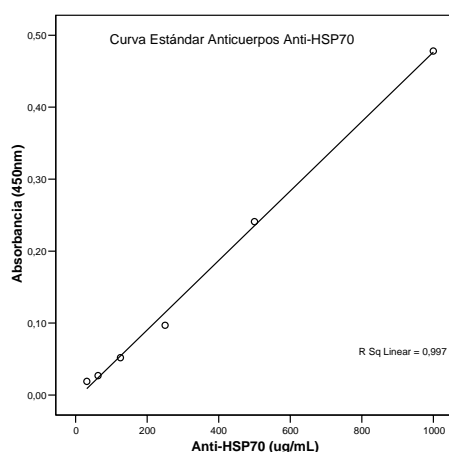
El grupo de riesgo vascular moderado G1, presenta los valores más altos, de importancia biológica relevante. La prueba KRUSKAL-WALLIS demuestra que no existen diferencias significativas entre los grupos. ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirma,

➤ ANTICUERPOS anti-Hsp70i

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la determinación de los niveles de anticuerpos (Ac) anti-Hsp70i, expresados en $\mu\text{g/mL}$, se resumen a continuación:

Intervalo de Medición (Linealidad)	31,25-1000
Límite de detección ([] mínima medible)	6,79
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	255-1205

Tabla 5.2-XVIII Características analíticas



Los resultados se obtienen por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados.

Figura 5.2-15 Curva Estándar obtenida en los ensayos para anticuerpos anti-Hsp70i

a) Población Global

Ac. anti-Hsp70i ($\mu\text{g/mL}$)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población Global	115	201,53	1632,41	593,43	271,63	1,013	0,256

Tabla 5.2-XIX Estadística descriptiva de la concentración de anticuerpos anti-Hsp70i obtenida en la población analizada

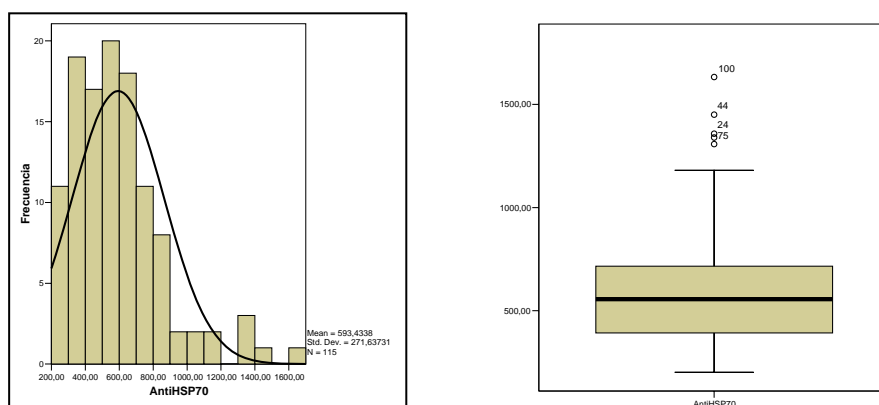


Figura 5.2-16 Distribución de los valores de anticuerpos anti-Hsp70i obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores de anticuerpos anti-Hsp70i obtenidos se ajustan a una distribución normal ($Z=1.013$, $p=0,256$), presentando una concentración media de $593,43 \mu\text{g/mL}$.

b) Agrupado por Sexo

Ac. anti-Hsp70i (µg/mL)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo	mujer	58	201,53	1450,12	601,01	266,44	0,931	0,351
	varón	57	234,30	1632,41	585,72	278,98	0,835	0,488

Tabla 5.2-XX Estadística descriptiva de los valores de Hsp70i obtenida en la población analizada, agrupada por sexo

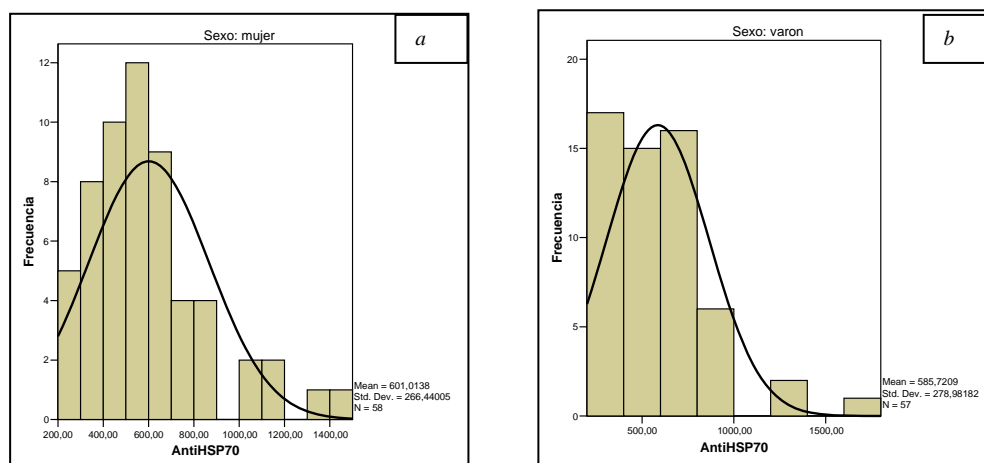
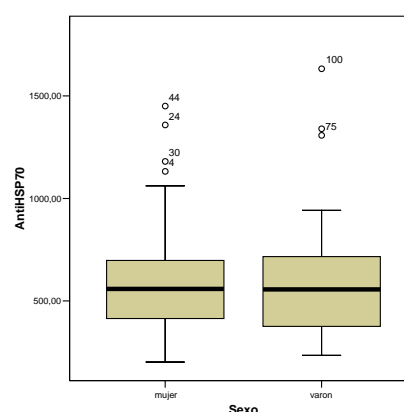


Figura 5.2-17 Distribución de los valores de anticuerpos anti-Hsp70i, agrupado por sexo. Donde: (a) mujer, (b) varón

	anti-Hsp70i
U de Mann-Whitney	1577,000
W de Wilcoxon	3230,000
Z	-,425
Sig. asintót. (bilateral)	,671

a Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	,084	,772	,301	113	,764	15,29292	50,86587
No se han asumido varianzas iguales			,301	112,546	,764	15,29292	50,88639

No existen diferencias significativas para los niveles de anticuerpos anti-Hsp70i, entre ambas poblaciones ($p = 0,764$).

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Ac. anti-Hsp70i (µg/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0 NO FRV	76	201,53	1358,05	599,00	262,26	0,860	0,450
G1 FRV MODERADO	29	234,30	1632,41	574,86	312,91	1,039	0,231
G2 ENFERMEDAD	10	267,91	1180,60	604,95	235,18	0,783	0,573

Tabla 5.2-XXI Media de la concentración de anticuerpos anti-Hsp70i obtenida, por grupo de riesgo vascular

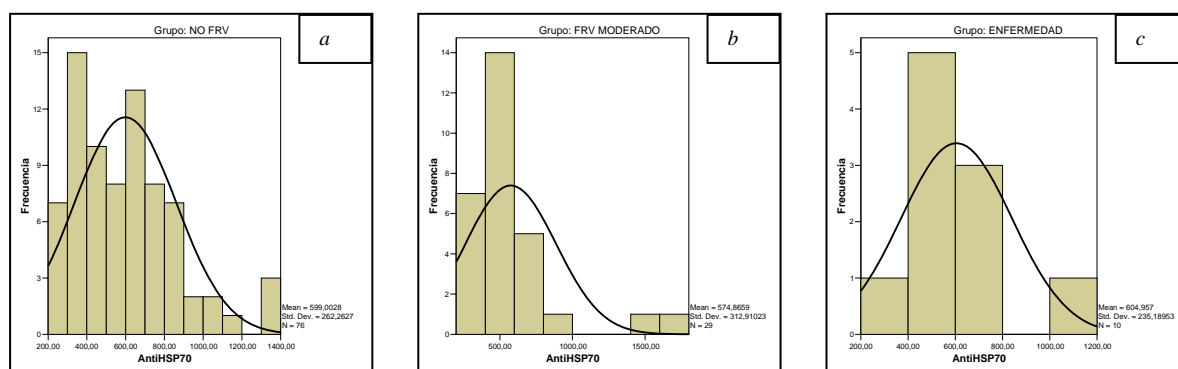
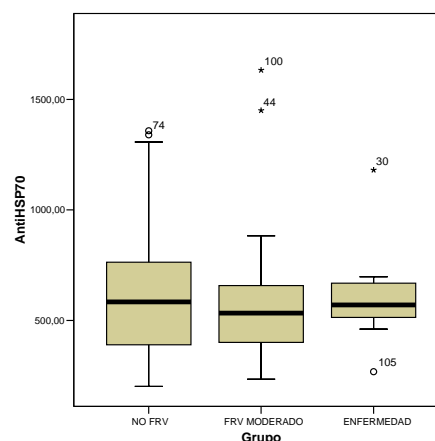


Figura 5.2-18 Distribución de los valores de anticuerpos anti-Hsp70i obtenida por grupo de riesgo vascular. Donde: (a) G0, (b) G1 y (c) G2

Kruskal-Wallis	anti-Hsp70i
Chi-cuadrado	,951
Gl	2
Sig. asintót.	,622

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13683,137	2	6841,569	,091	,913
Intra-grupos	8398014,984	112	74982,277		
Total	8411698,121	114			



Comparaciones múltiples

Variable dependiente: anticuerpos anti-Hsp70i

Bonferroni

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	24,13690	59,76792	1,000	-121,1272	169,4010
	G2=ENFERMEDAD	-5,95424	92,11317	1,000	-229,8325	217,9240
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	-24,13690	59,76792	1,000	-169,4010	121,1272
	G2=ENFERMEDAD	-30,09114	100,41824	1,000	-274,1546	213,9723
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	5,95424	92,11317	1,000	-217,9240	229,8325
	G1=FRV MODERADO	30,09114	100,41824	1,000	-213,9723	274,1546

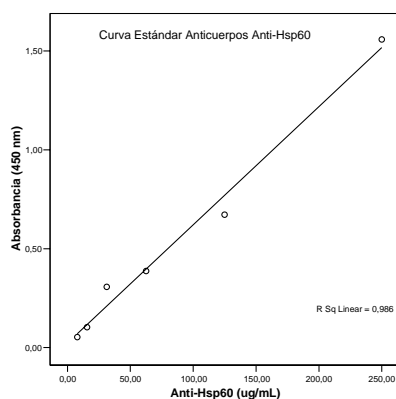
La prueba de KRUSKAL-WALLIS demuestra que no existen diferencias significativas entre los grupos. ANOVA y el análisis de Bonferroni lo confirma.

➤ ANTICUERPOS anti-Hsp60

Las características analíticas del procedimiento utilizado para la medición de la concentración de anticuerpos circulantes anti-HSP60, expresada en $\mu\text{g/mL}$, se resumen a continuación:

Intervalo de Medición (Linealidad)	7,81-250
Límite de detección ($[]$ mínima medible)	2,88
Imprecisión intraserie (%CV)	<10%
Imprecisión interserial (%CV)	<10%
Valores de referencia	$P_{95} = 168$

Tabla 5.2-XXII Características analíticas



Los resultados se obtienen por interpolación en la curva de calibración incluida en cada uno de los ensayos realizados.

Figura 5.2-19 Curva Estándar obtenida en los ensayos para anticuerpos anti-HSP60

a) Población Global

Ac. anti-Hsp60 ($\mu\text{g/mL}$)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Población Global	115	10,01	346,50	61,44	59,31	2,207	0,000**

Tabla 5.2-XXIII Estadística descriptiva de la concentración de anticuerpos anti-Hsp60 obtenida en la población analizada

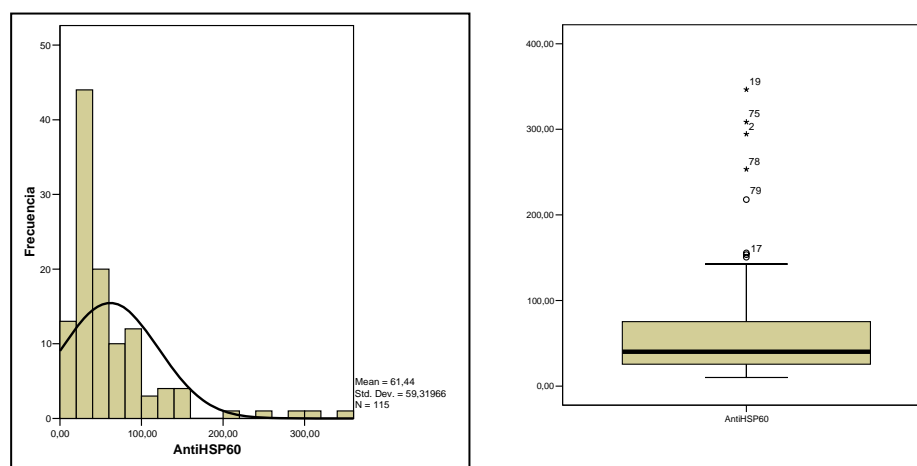


Figura 5.2-20 Distribución de los valores de anticuerpos anti-HSP60 obtenida en la población analizada

Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la normalidad, los valores concentración de anticuerpos anti-Hsp60 obtenidos, NO se ajustan a una distribución normal ($Z=2.207$, $p=0,000$), y presenta una concentración media de $61,44 \mu\text{g/mL}$.

b) Agrupado por sexo

Ac. anti-Hsp60 ($\mu\text{g/mL}$)		N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
Sexo	mujer	58	10,01	346,50	66,97	61,75	1,447	0,030*
	varón	57	13,78	308,55	55,80	56,71	1,973	0,001**

Tabla 5.2-XXIV Estadística descriptiva de los valores de Hsp60 obtenida en la población analizada, agrupada por sexo

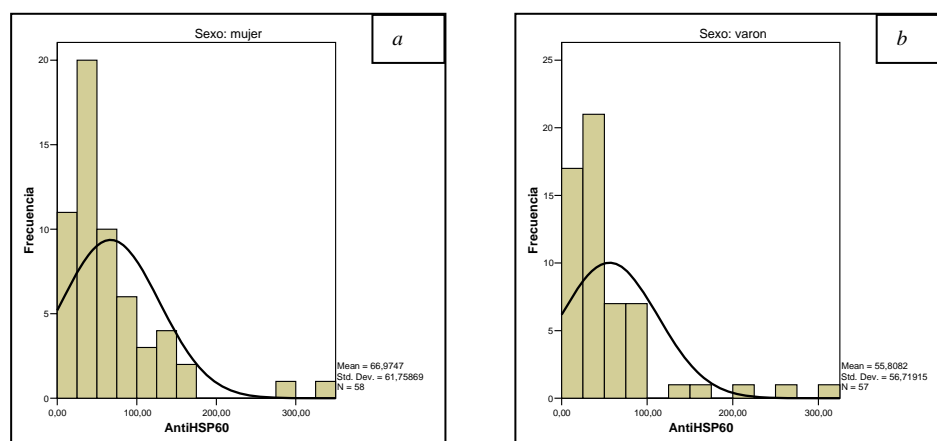
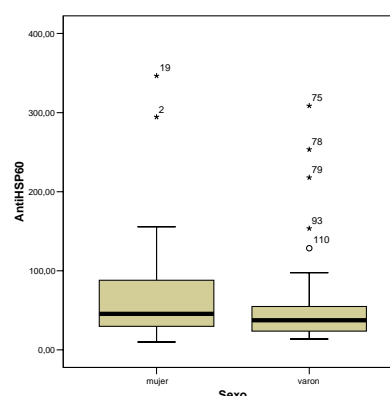


Figura 5.2-21 Distribución de los valores de anticuerpos anti-Hsp60 obtenida, agrupado por sexo. Donde: (a) mujer, (b) varón

	AntiHSP60
U de Mann-Whitney	1374,000
W de Wilcoxon	3027,000
Z	-1,561
Sig. asintót. (bilateral)	,119

a Variable de agrupación: Sexo



Prueba T comparación de muestras independientes para la igualdad de medias	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Se han asumido varianzas iguales	,539	,464	1,009	113	,315	11,16641	11,06268
No se han asumido varianzas iguales			1,010	112,489	,315	11,16641	11,05444

Se observa que el grupo de mujeres presenta valores mayores que el grupo de varones. U de Mann Whitney demuestra que NO existen diferencias significativas para los niveles de anticuerpos anti-Hsp60, entre ambas poblaciones ($p = 0,119$).

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Ac. Anti-Hsp60 (µg/mL)	N	Mín.	Máx.	Media	s	Z de K-S	Sig.asintót (bilateral)
G0 NO FRV	76	10,01	346,50	69,41	68,26	1,712	0,006**
G1 FRV MODERADO	29	11,15	155,57	47,42	36,05	1,378	0,045**
G2 ENFERMEDAD	10	23,67	54,42	41,43	9,05	0,470	0,980

Tabla 5.2-XXV Media de la concentración de anticuerpos anti-Hsp60 obtenida por grupo de riesgo vascular

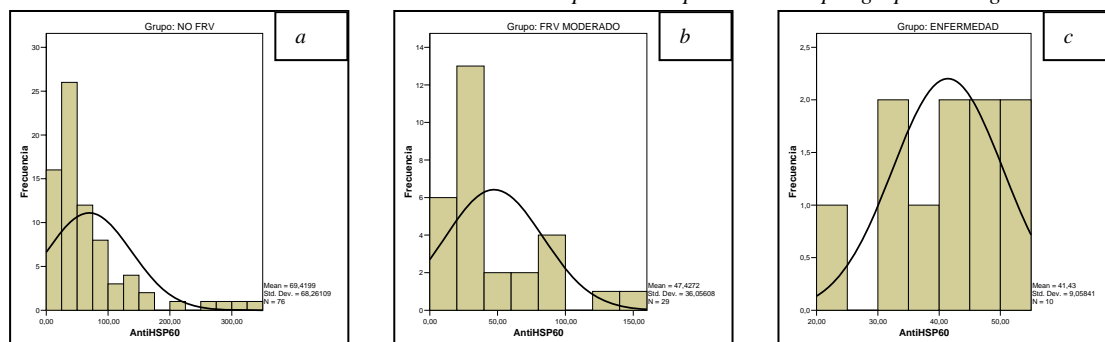
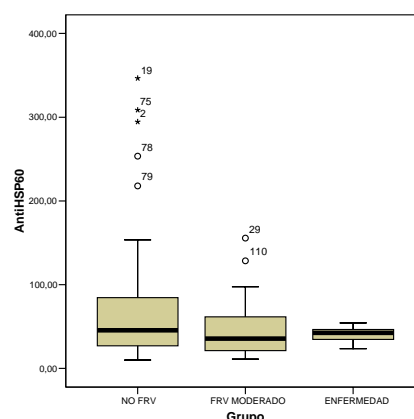


Figura 5.2-22 Distribución de valores de anticuerpos anti-Hsp60 por grupo de riesgo vascular. Donde:(a) G0, (b)G1, (c) G2

Kruskal-Wallis	anti-Hsp60
Chi-cuadrado	3,067
Gl	2
Sig. asintót.	,216

Variable de agrupación: Grupo

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14537,917	2	7268,958	2,106	,127
Intra-grupos	386607,842	112	3451,856		
Total	401145,759	114			



Comparaciones múltiples

Variable dependiente: anticuerpos anti-Hsp60

Bonferroni

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
G0=NO FRV	G1=FRV MODERADO	21,99263	12,82375	,267	-9,1751	53,1604
	G2=ENFERMEDAD	27,98987	19,76372	,478	-20,0453	76,0250
G1=FRV MODERADO	G0=NO FRV	-21,99263	12,82375	,267	-53,1604	9,1751
	G2=ENFERMEDAD	5,99724	21,54565	1,000	-46,3688	58,3633
G2=ENFERMEDAD	G0=NO FRV	-27,98987	19,76372	,478	-76,0250	20,0453
	G1=FRV MODERADO	-5,99724	21,54565	1,000	-58,3633	46,3688

Se observa que el G2 presenta los niveles más bajos. La prueba de KRUSKAL-WALLIS arroja diferencias próximas a la significación estadística ($p=0,216$). La U de Mann-Whitney demuestra que las diferencias se producen entre G0:G1 ($p=0,091$). La prueba ANOVA ($p=0,127$) confirma lo anterior.

5.3 RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsps y ANTICUERPOS anti-Hsps), HOMOCISTEÍNA y PROTEÍNA C REACTIVA (objetivo 3.1)

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el análisis de correlaciones no paramétricas entre Hsps, tHcy y RCP siguiendo el mismo esquema de agrupación. Solo se presentan aquellas correlaciones que alcanzan significación estadística, así como las que podrían ser de interés biológico.

a) Población Global

<i>Rho de Spearman</i>		tHcy
AntiHsp70	Coefficiente de correlación	,166
	Sig. (bilateral)	,076
	N	115
PCR	Coefficiente de correlación	,283**
	Sig. (bilateral)	,002
	N	115

** La correlación es significativa al nivel 0,01(bilateral)

Tabla 5.3-I . Rho de Spearman para correlación entre [Anti-HSP70], [PCR] y [tHcy]

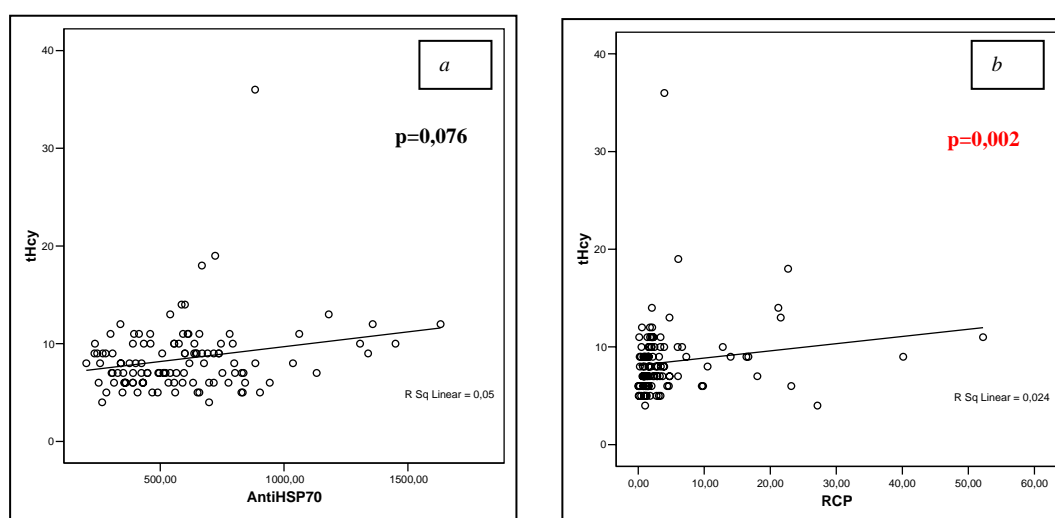


Figura 5.3-1 a).- Correlación entre anticuerpos anti-Hsp70 y [tHcy] y b).- correlación entre [tHcy] y [PCR]

Analizada la población global, se demuestra que **no** existe correlación entre los niveles de tHcy y [Hsp70i] intraleucocitaria, ni sérica.

Existe una correlación directa, próxima a la significación estadística entre [tHcy] y anticuerpos [anti-Hsp70] circulantes ($p=0,076$) y correlación positiva significativa entre [tHcy] y [PCR]

b) Agrupado por Sexo

Se realiza correlación bivariada para estudio de la posible relación entre las proteínas de choque térmico (Hsp70i intraleucocitaria y sérica, y niveles de anticuerpos circulantes anti-Hsp70 y anti-Hsp60) con homocisteína y PCR, agrupado por sexo.

<i>Rho de Spearman</i>		<i>tHcy</i>
PCR	Coefficiente de correlación	,347**
	Sig. (bilateral)	,008
	N	58

** La correlación es significativa al nivel 0,01(bilateral)

Tabla 5.3-II . Rho de Spearman para correlación entre [Anti-HSP70], [PCR] y [tHcy]

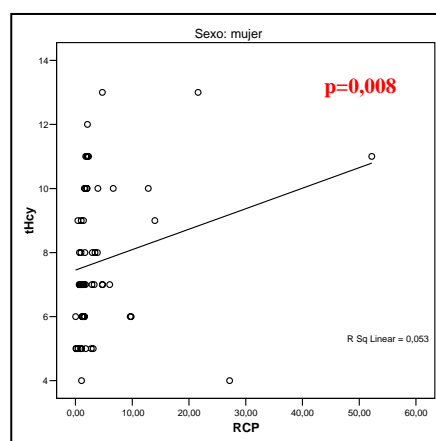


Figura 5.3-2 .- Correlación entre [tHcy] y [PCR]

El análisis demuestra que no existe correlación entre [Hsp70i] intraleucocitarias, séricas con homocisteína ni con PCR, en ninguno de los dos grupos.

Sin embargo en el grupo de mujeres, se demuestra correlación positiva estadísticamente significativa ($p=0,008$) entre los niveles PCR y tHcy.

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Se realiza correlación bivariada entre los niveles de Hsp70i intraleucocitaria, sérica, niveles de anticuerpos circulantes anti-Hsp70, anti-Hsp60, tHcy y PCR en la población agrupada por riesgo vascular. Se obtiene el coeficiente Rho de Spearman. Se presentan las tablas de los grupos con significación estadística

G1=FRV MODERADO			G0= No FRV		
Rho de Spearman		tHcy	Rho de Spearman		tHcy
AntiHsp70	Coeficiente de correlación	,522(**)	PCR	Coeficiente de correlación	,263(*)
	Sig. (bilateral)	,004		Sig. (bilateral)	,022
	N	29		N	76

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 5.3-II . Rho de Spearman para correlación entre [tHcy] y [Anti-Hsp70].

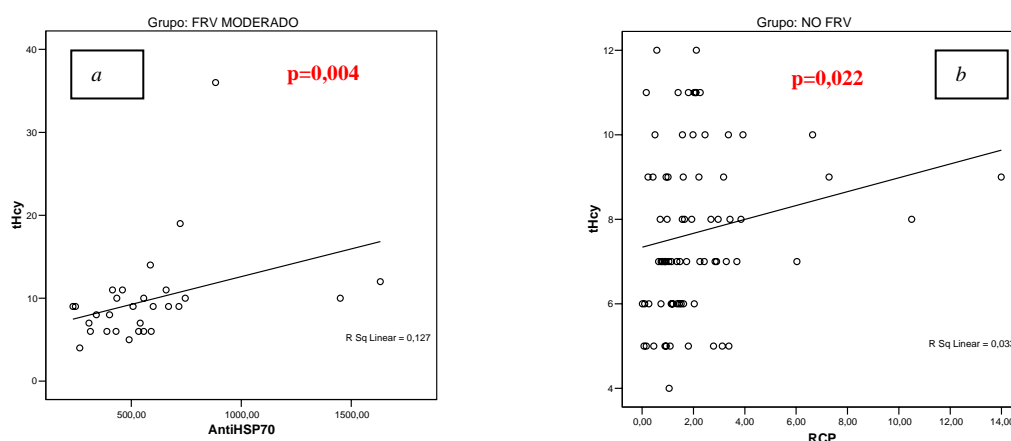
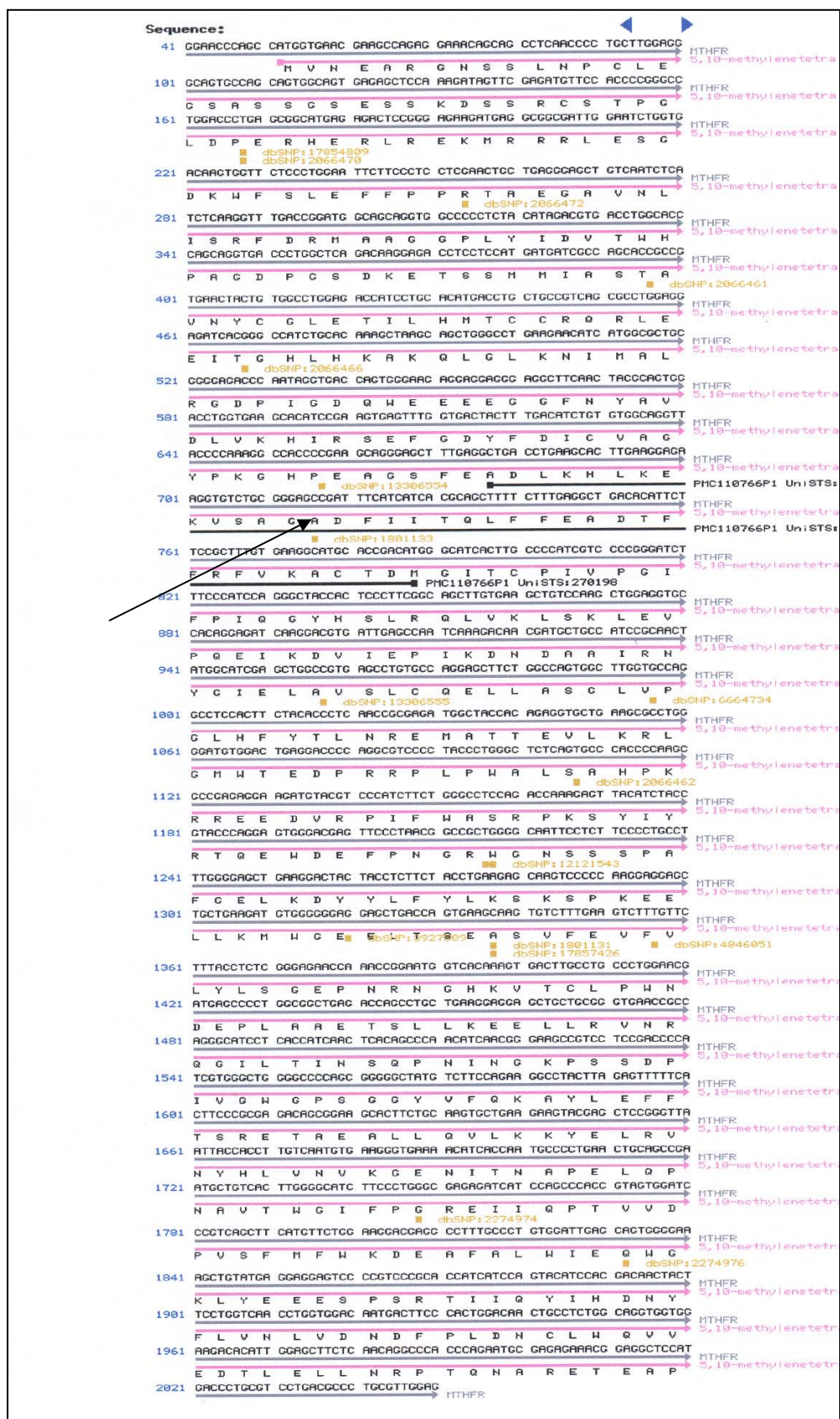


Figura 5.3-2 -a.-Correlación obtenida entre [tHcy] y [anti-HSP70], en G1
b.- Correlación obtenida entre [tHcy] y [anti-HSP70], en G1

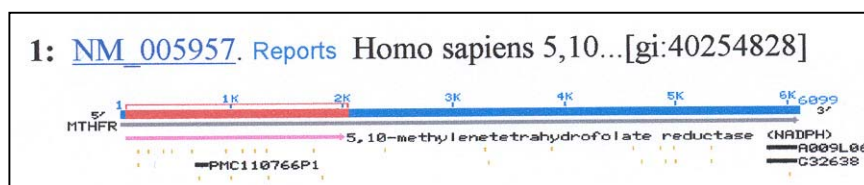
Analizada la población por factores de riesgo vascular, se observa que en el G1 existe correlación positiva ($p=0,004$) entre los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes y tHcy, especialmente en el grupo de los varones ($,558^*$, $p=0,011$, $n=20$). En el grupo sin factores de riesgo (G0) se demuestra correlación positiva ($p=0,022$) entre los niveles de tHcy y PCR, a costa del grupo de las mujeres ($0,398^{**}$, $p=0,007$, $n=44$).

5.4 ESTUDIO MOLECULAR DEL POLIMORFISMO 677C>T DEL GEN QUE CODIFICA LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) (objetivo 3.2)

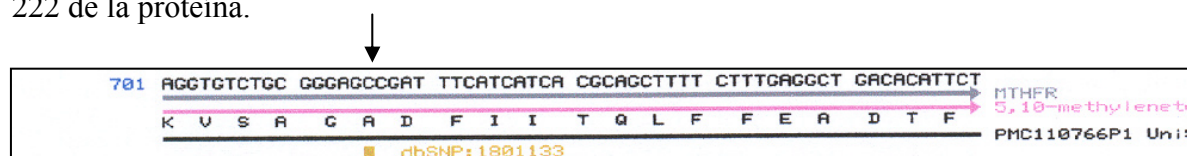
Figura 5.4-1 Secuencia del gen que codifica la enzima MTHFR publicada en el GenBank



El gen que codifica la MTHFR, se encuentra en la región 1p.36.3, del brazo corto del cromosoma 1, con código de acceso al GenBank gi:40254828 (Desde feb-2008 nuevo código gi: 87239999)



La secuencia salvaje se muestra ampliada en la figura siguiente. El polimorfismo 677C>T, señalado como dbSNP:1801133 (rs1801133), convierte el triplete GCC que codifica para alanina, en GTC, que codifica para valina, dando lugar al cambio Ala→Val en el aminoácido 222 de la proteína.



Una vez realizada la PCR, el producto obtenido (209pb) se digiere con la enzima de restricción *Hind* I. Los fragmentos obtenidos, una vez realizada la electroforesis sobre gel de agarosa al 6%, se visualizan por UV, mediante un transiluminador, tal como muestra la figura.

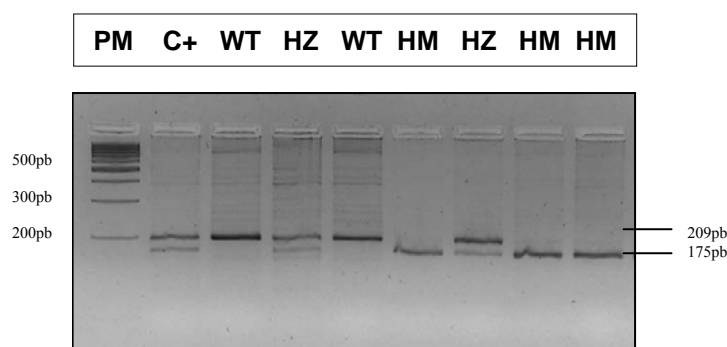


Figura 5.4-2 Gel de agarosa(4%) que contiene la digestión con *Hinf*I. Donde:PM= Escalera de pares de bases, C+= Control positivo heterocigoto, WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto, HM=homocigoto mutado

La realización de la PCR a tiempo real confirma los resultados. Las figuras muestran las curvas de fusión obtenidas para los controles positivos (C+:heterocigoto) y control negativo, incluidos en todas las PCR realizadas, así como una serie de muestras incluidas.

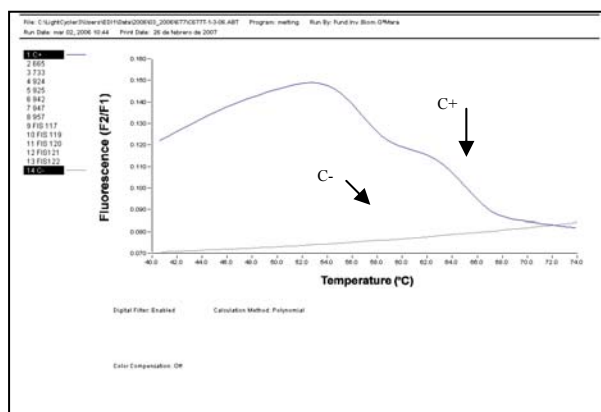


Figura 5.4-3 Curva de Fusión obtenida para el Control+y C-

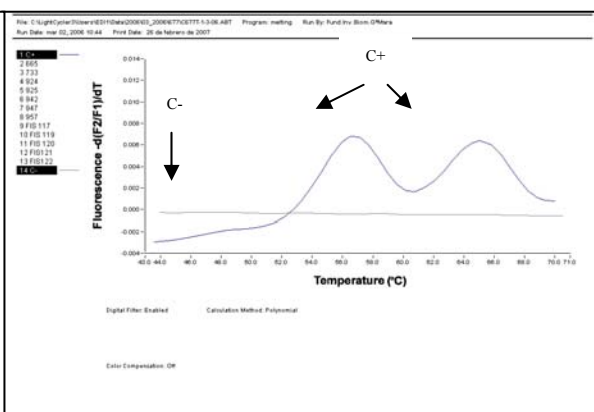


Figura 5.4-4 Análisis F2/F1 de los fragmentos

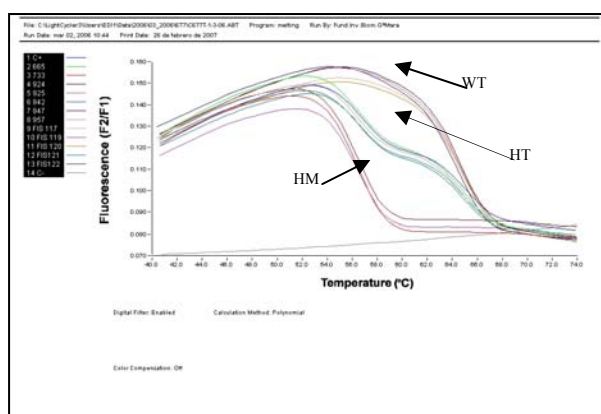


Figura 5.4-5 Curvas de fusión obtenidas para muestras y controles

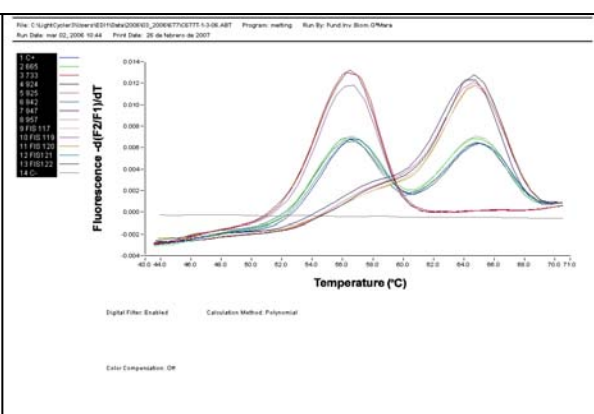
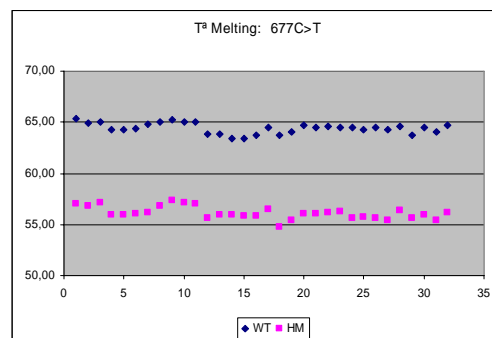


Figura 5.4-6 Análisis F2/F1 de los fragmentos

Las características analíticas del procedimiento molecular se resumen en la tabla 5.4-I. El límite de detección del procedimiento para PCR es de 1,34 ng/μL de ADN.

Intraserie				
	Tª Ref	Media	s	%CV
Tª Melting (°C): TM (WT)	63,0	63,83	0,15	0,23
Tª Melting (°C): TM (HM)	54,5	55,78	0,23	0,41
Interserie				
		Media	s	%CV
Tª Melting (°C): TM (WT)	63,0	64,39	0,52	0,81
Tª Melting (°C): TM (HM)	54,5	56,13	0,61	1,08

Tabla 5.4-I Características analíticas



a) Población Global

MTHFR: 677C>T		Frecuencia	%
WT	Genotipo: CC	42	36,5
HT	: CT	51	44,3
HM	: TT	22	19,1
Total		115	100,0

Tabla 5.4-II Frecuencia encontrada del SNP 677 C> T

Donde: **WT**=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

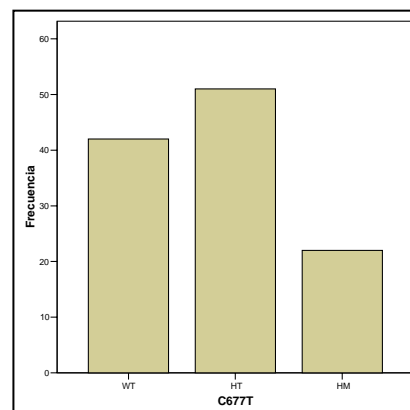


Figura 5.4-7 Frecuencia de aparición de los distintos genotipos

El 44,3% de la población analizada, presenta el polimorfismo en heterocigosis, porcentaje superior al observado para el estado salvaje homocigoto normal (genotipo CC, *wild type*), que se presenta en el 36,5% de la población. En las tablas 5.4-III y 5.4-IV, se recogen las frecuencias y distribución alélicas observadas, así como la distribución de los genotipos y relación entre genotipo observado / esperado.

Nº Casos	Frecuencia alélica		Distribución alélica	
	<i>p</i> (C)	<i>q</i> (T)	C (CC+CT)	T (CT+TT)
115	0,58	0,42	135(58,69%)	95(41,30%)

Tabla 5.4-III Frecuencia y Distribución alélica para C y T

Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
115	42	51	22	1,0	0,9	1,0

Tabla 5.4-IV Distribución de genotipos MTHFR y Equilibrio Hardy-Weinberg

La distribución de genotipos encontrada en la población general, está en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

b) Agrupado por sexo

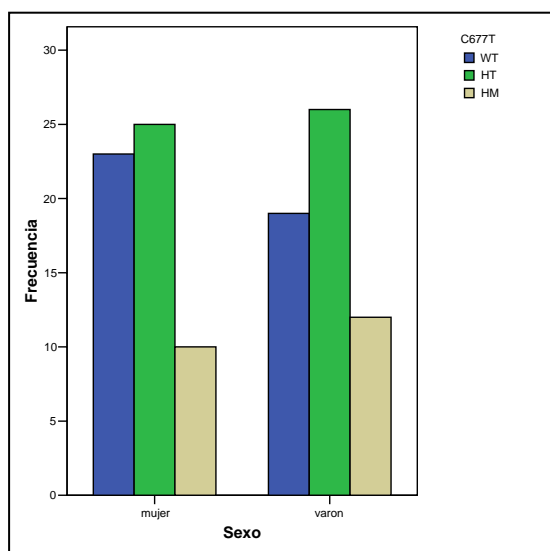


Figura 5.4-8 Frecuencias de genotipos, por sexo

MTHFR: 677C>T			Nº Casos	%
Sexo	mujer	WT	23	39,7
		HT	25	43,1
		HM	10	17,2
		Total	58	100,0
	varón	WT	19	33,3
		HT	26	45,6
		HM	12	21,1
		Total	57	100,0

Tabla 5.4-V Frecuencia encontrada del SNP 677 C> T

Donde: WT=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

En las tablas 5.4-VI y 5.4-VII, se recogen las frecuencias y distribución alélicas observadas, así como la distribución de los genotipos y relación entre genotipo observado / esperado.

	Frecuencia Alélica		Distribución Alélica	
	p(C)	q(T)	C (CC+CT)	T (CT+TT)
Mujeres	0,61	0,39	71(61,20%)	45(38,79%)
Varones	0,56	0,44	64(56,14%)	50(43,85%)

Tabla 5.4-VI Frecuencia y Distribución alélica para C y T, agrupado por sexo

	Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
		CC	CT	TT	CC	CT	TT
Mujeres	58	23	25	10	1,06	0,90	1,13
Varones	57	19	26	12	1,06	0,92	1,08

Tabla 5.4-VII Distribución de genotipos MTHFR y Equilibrio Hardy-Weinberg, agrupado por sexo

Al analizar la frecuencia de aparición del polimorfismo, se observa que el 21,1% de los varones son homocigotos mutados (HM), frente al 17,2% del grupo de mujeres, aunque la diferencia no alcanza significación estadística ($p=0,389$).

Pruebas de chi-cuadrado	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	,270 ^b	1	,603	,642		
Corrección por continuidad ^a	,080	1	,778			
Razón de verosimilitud	,270	1	,603	,642		
Estadístico exacto de Fisher				,642	,389	
Asociación lineal por lineal	,268 ^c	1	,456	,523	,389	,164
N de casos válidos	115					

(a) Calculado sólo para una tabla de 2x2. b) 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,90. (c) El estadístico tipificado es ,517.

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

MTHFR: 677C→T		Nº Casos	%
G0=NO FRV	WT	29	38,2
	HT	37	48,7
	HM	10	13,2
	Total	76	100,0
G1=FRV MODERADO	WT	10	34,5
	HT	10	34,5
	HM	9	31,0
	Total	29	100,0
G2=ENFERMEDAD	WT	3	30,0
	HT	4	40,0
	HM	3	30,0
	Total	10	100,0

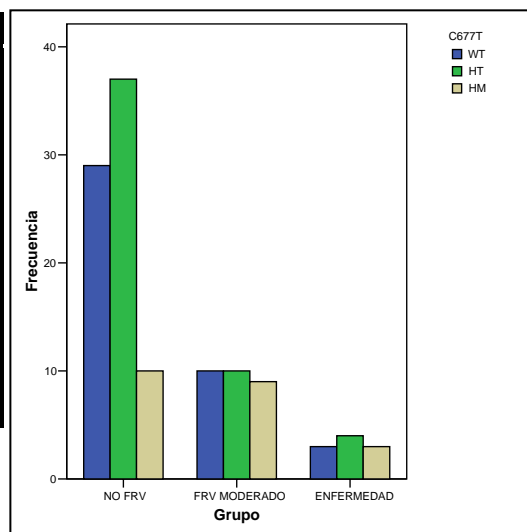


Tabla 5.4-VIII Frecuencia encontrada del SNP 677 C> T

Donde: **WT**=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

Las tablas 5.4-IX y 5.4-X, recogen las frecuencias y distribución alélicas observadas, así como la distribución de los genotipos y relación entre genotipo observado / esperado.

	Frecuencia Alélica		Distribución Alélica	
	p(C)	q(T)	C (CC+CT)	T (CT+TT)
G0=NO FRV	0,62	0,38	95(62,50%)	57(37,50%)
G1=FRV MODERADO	0,51	0,49	30(51,72%)	28(48,27%)
G2=ENFERMEDAD	0,50	0,50	10(50,0%)	10(50,0%)

Tabla 5.4-IX Frecuencia y Distribución alélica para C y T, por grupo de riesgo vascular

	Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
		CC	CT	TT	CC	CT	TT
G0=NO FRV	76	29	37	10	0,99	1,03	0,91
G1=FRV MODERADO	29	10	10	9	1,32	0,69	1,29
G2=ENFERMEDAD	10	3	4	3	1,20	0,80	1,20

Tabla 5.4-X Distribución de genotipos MTHFR y Equilibrio Hardy-Weinberg, por grupo de riesgo vascular

Como se observa la frecuencia de aparición del genotipo TT es más alta en los grupos con factores de riesgo moderado y enfermedad (G1 y G2) que en el grupo sin factores de riesgo (G0), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2=5,167$, $p=0,027$ y prueba exacta de Fisher $p=0,043$).

Pruebas de chi-cuadrado	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	5,167 ^b	1	,023	,027	,023	,017
Corrección por continuidad ^a	4,092	1	,043			
Razón de verosimilitud	4,935	1	,026	,043	,023	
Estadístico exacto de Fisher				,043	,023	
Asociación lineal por lineal	5,122 ^c	1	,024	,027	,023	
N de casos válidos	115					

(a) Calculado sólo para una tabla 2x2 b) 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 7,46 (c) El estadístico tipificado es 2,263.

5.5 INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO 677C>T EN LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA (objetivo 3.2)

Se presenta en este punto la posible influencia de la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T, en los niveles circulantes de tHcy, siguiendo el mismo esquema de análisis.

a) Población Global

tHcy					
677C>T	N	Mín	Máx	Media	s
WT	42	5	13	8,17	2,083
HT	51	4	18	7,86	2,592
HM	22	5	36	10,41	6,602

Tabla 5.5-I Niveles de tHcy, agrupado por 677C>T. Donde:

WT=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

Kruskal-Wallis	tHcy
Chi-cuadrado	3,778
gl	2
Sig. Asintót.	,151

Variable de agrupación: 677C>T

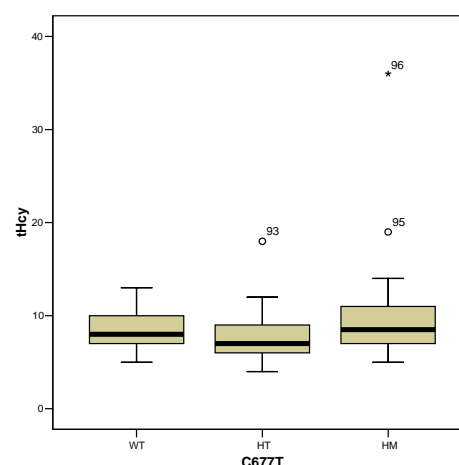


Figura 5.5-1 Niveles de tHcy, agrupado por 677C>T

Prueba de Mann-Whitney para 2 muestras independientes					tHcy
677C>T	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	405,000
HT	51	33,94	1731,00	W de Wilcoxon	1731,000
HM	22	44,09	970,00	Z	-1,897
Total	73			Sig. Asintót. (bilateral)	,058

a Variable de agrupación: 677C>T

Los sujetos HM para el polimorfismo 677C>T, presenta los niveles de homocisteína mas altos, mientras que el grupo de heterocigotos, presenta los niveles más bajos.

Al comparar los grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis se demuestra la existencia de diferencias próximas a la significación estadística ($p=0,151$), que al aplicar la U de Mann-Whitney, se demuestra que las diferencias ($p=0,058$) se producen entre los grupos HT y HM para la 677C>T. La prueba de ANOVA ($p=0,019$) y la comparación de Bonferroni ($p=0,018$) confirma las diferencias encontradas.

b) Agrupado por sexo

Al segmentar la población por genotipos y sexo, y aplicar la prueba de Mann-Whitney se demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0,003$) para [tHcy] entre ambos sexos, cuando la mutación está presente en homocigosis (677C>T: HM), siendo superiores en varones.

tHcy						
677C>T	Sexo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer	23	5	13	8,17	2,51
	varon	19	5	10	8,16	1,46
HT	mujer	25	4	12	7,56	2,31
	varon	26	5	18	8,15	2,85
HM	mujer	10	5	9	7,10	1,19
	varon	12	6	36	13,17	7,98

Tabla 5.5-II Niveles de tHcy, agrupado por 677C>T y sexo

Prueba comparación muestras independientes Mann-Whitney		
677C>T		tHcy
HM	U de Mann-Whitney	14,500
	W de Wilcoxon	69,500
	Z	-3,021
	Sig. Asintót. (bilateral)	,003
	Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	,002(a)

(a) No corregidos para los empates. Variable de agrupación: Sexo

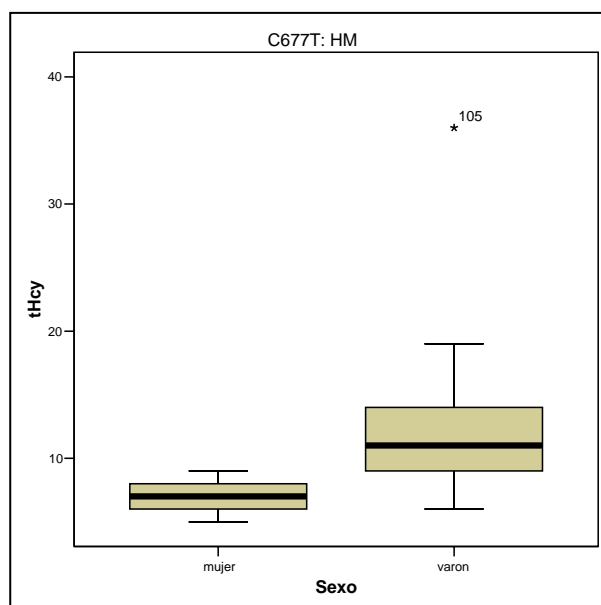


Figura 5.5-2 Niveles de tHcy, por sexo cuando 677C>T:HM

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Al segmentar por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observa un aumento de los niveles de tHcy con la presencia de factores de riesgo, tanto en los sujetos WT, como en los sujetos HT. Al aplicar Kruskal-Wallis se demuestran diferencias próximas a la significación estadística para ambas situaciones (WT:p=0,197 y HT:p=0,088). La prueba de Mann-Whitney confirma que las diferencias se produce de forma significativa entre los sujetos HT que pertenecen a los grupos G0:G2 (p=0,032) y G1:G2 (p=0,084), mientras que en los sujetos WT las diferencias entre G0:G2 (p=0,115) están próximas a la significación estadística. Al analizar con Anova de un factor con corrección de Bonferroni, las diferencias se demuestran en todos los casos y alcanzan significación estadística. WT: G0:G2 p=0,030 y HT: [(G0:G2 p=0,007) y (G1:G2 p=0,044)].

tHcy						
677C>T	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	29	5	11	7,79	1,780
	G1=FRV MODERADO	10	5	11	8,40	2,011
	G2=ENFERMEDAD	3	7	13	11,00	3,464
HT	G0=NO FRV	37	4	12	7,46	2,142
	G1=FRV MODERADO	10	4	12	7,90	2,470
	G2=ENFERMEDAD	4	9	18	11,50	4,359
HM	G0=NO FRV	10	5	12	8,20	2,044
	G1=FRV MODERADO	9	6	36	13,33	9,407
	G2=ENFERMEDAD	3	6	14	9,00	4,359

Tabla 5.5-IV Niveles de tHcy, agrupado por 677C>T y edad

Prueba de Kruskal-Wallis		
677C>T		tHcy
WT	Chi-cuadrado	3,249
	gl	2
	Sig. Asintót.	,197
HT	Chi-cuadrado	4,861
	gl	2
	Sig. Asintót.	,088

Variable de agrupación: Grupo

677C>T	Estadísticos de contraste (b)	tHcy (G0:G2)	tHcy (G1:G2)
WT	U de Mann-Whitney	19,500	7,000
	W de Wilcoxon	454,500	62,000
	Z	-1,576	-1,371
	Sig. Asintót. (bilateral)	,115	,170
	Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	,127(a)	,217(a)
HT	U de Mann-Whitney	26,000	8,000
	W de Wilcoxon	729,000	63,000
	Z	-2,143	-1,726
	Sig. Asintót. (bilateral)	,032	,084
	Sig. Exacta [2*(Sig. Unilateral)]	,033(a)	,106(a)

a No corregidos para los empates.

B Variable de agrupación: Grupo

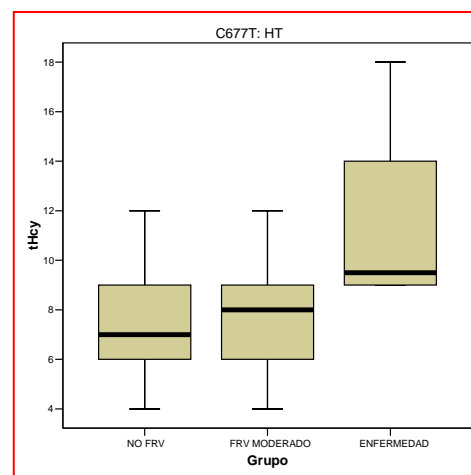


Figura 5.5-4 [tHcy] por grupo de riesgo y con 677C>T :HT

5.6 INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO 677C>T SOBRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO y ANTICUERPOS anti-Hsps

Se presenta en este punto la posible influencia de la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T, en los niveles de HSPs y anticuerpos anti-HSPs, siguiendo el mismo esquema de análisis.

a) Población Global

	677C>T	N	Mín.	Máx.	Media	s
Hsp70 PMNs	WT	42	4,64	74,91	30,96	18,01
	HT	51	2,62	67,83	29,03	17,68
	HM	22	5,67	160,75	37,70	33,27
Hsp70 suero	WT	42	,43	7,54	1,90	1,30
	HT	51	,19	3,65	1,42	,75
	HM	22	,57	4,03	1,72	,99
AntiHsp70	WT	42	234,30	1450,12	629,27	302,17
	HT	51	236,35	1632,41	572,13	281,81
	HM	22	201,53	884,10	574,38	170,69
AntiHsp60	WT	42	11,15	308,55	76,34	70,53
	HT	51	10,01	346,50	54,26	55,35
	HM	22	13,78	155,57	49,62	37,11

Tabla 5.6-I Niveles de HSPs intraleucocitarias, séricas y anticuerpos anti-Hsps circulantes, agrupado por 677C>T. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

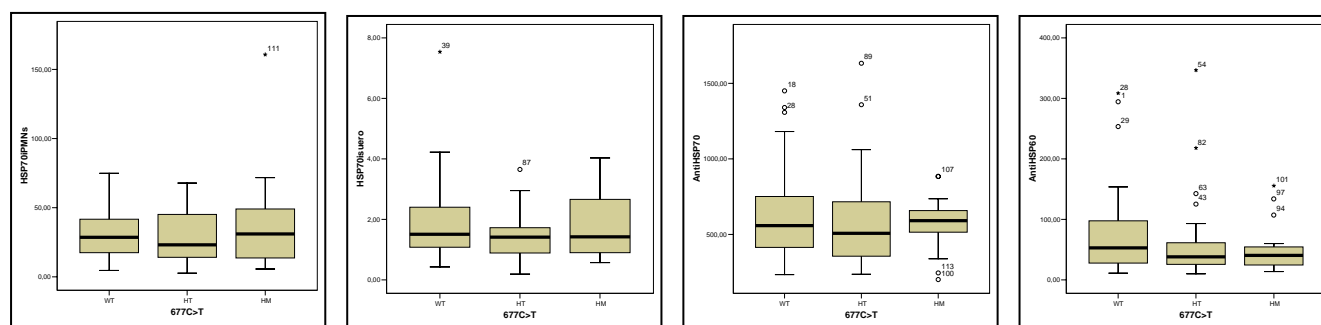


Figura 5.6-1 Niveles de Hsps y anticuerpos anti-HSPs, agrupado por 677C>T

Kruskal-Wallis	Hsp70 PMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Chi-cuadrado	,880	2,792	,956	2,881
gl	2	2	2	2
Sig. Asintót.	,644	,248	,620	,237

Variable de agrupación: 677C>T

Aunque no existen diferencias significativas entre grupos, los sujetos HM para 677C>T, presentan los valores mas altos de Hsp70 intracelulares, y las menores concentraciones de anticuerpos circulantes anti-Hsp60, mientras que los sujetos HT, son los que presentan menor concentración de Hsp70 séricas e intracelulares.

b) Agrupado por Sexo

Al segmentar la población por sexo y genotipo y aplicar la prueba de Mann-Whitney se demuestran diferencias muy próximas a la significación entre ambos sexos:

- 1) en los niveles de Hsp70 intraleucocitarias en el grupo WT, y
- 2) en los niveles de anticuerpos Anti-Hsp60, en el grupo HM para la 677C>T.

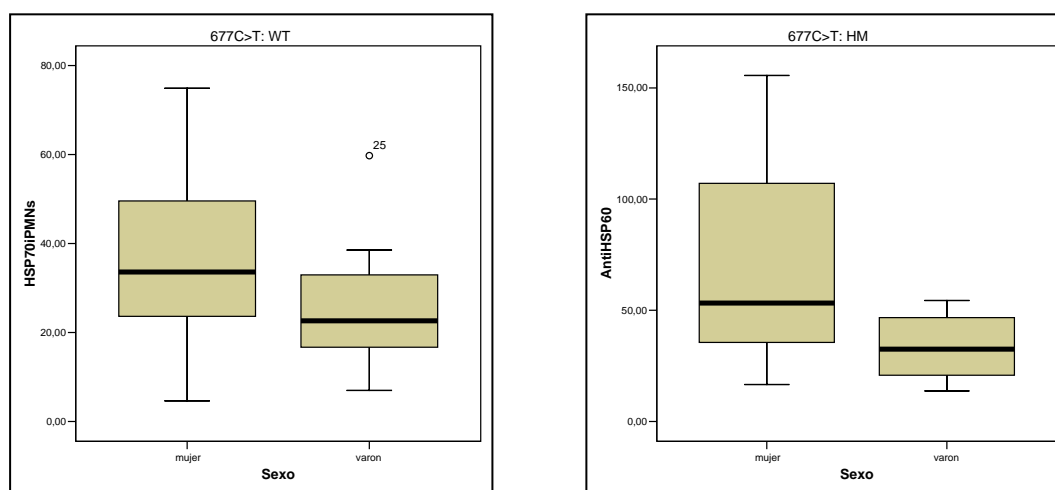


Figura 5.6-2 a.-Niveles de Hsp70 (PMNs), por sexo con genotipo CC (WT)
b.- Niveles de anticuerpos anti-Hsp60, por sexo con genotipo TT (HM)

C677T	Sexo		N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer	Hsp70 PMNs	23	4,64	74,91	36,01	20,21
	varon		19	6,98	59,76	24,86	12,97
HT	mujer		25	4,96	67,83	29,57	18,41
	varon		26	2,62	58,37	28,51	17,29
HM	mujer		10	5,78	54,63	30,80	17,76
	varon		12	5,67	160,75	43,45	42,14
WT	mujer	AntiHSP60	23	11,15	294,47	72,43	62,29
	varon		19	17,77	308,55	81,09	80,91
HT	mujer		25	10,01	346,50	61,32	67,83
	varon		26	18,33	217,88	47,47	40,14
HM	mujer		10	16,61	155,57	68,55	47,25
	varon		12	13,78	54,42	33,84	14,33

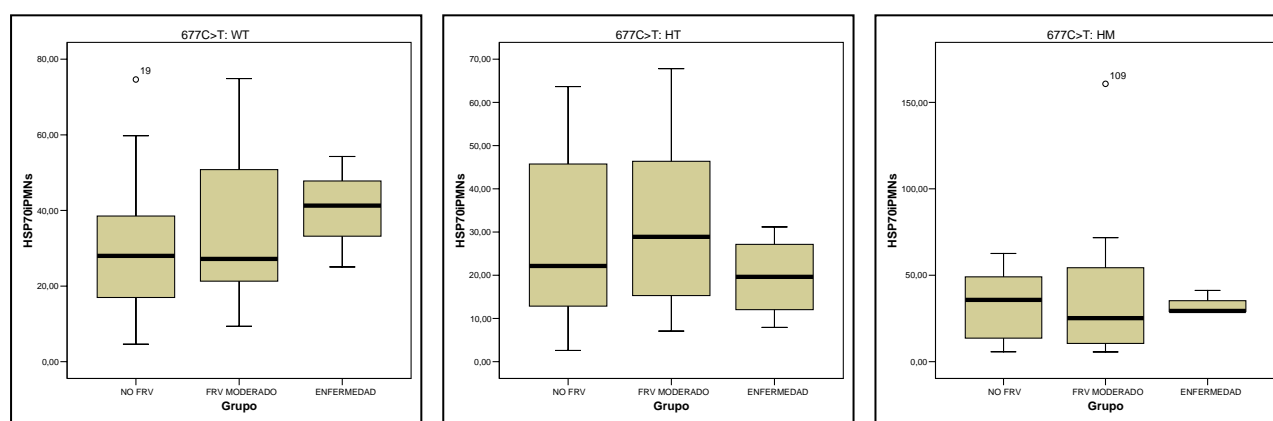
Tabla 5.6-II Niveles de Hsp70PMN y Anticuerpos Anti-Hsp60, agrupado por 677C>T y sexo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Las mujeres WT (genotipo CC) presentan niveles de Hsp70 PMNs mayores que los varones WT ($p=0,067$, Mann-Whitney), mientras que las mujeres HM (genotipo TT) arrojan valores más altos de anticuerpos anti-Hsp60 que los varones HM ($p=0,056$, Mann-Whitney).

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Hsp70 PMNs						
677C>T	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	29	4,64	74,63	28,84	17,37
	G1=FRV MODERADO	10	9,38	74,91	34,34	20,89
	G2=ENFERMEDAD	3	25,08	54,28	40,22	14,62
HT	G0=NO FRV	37	2,62	63,66	29,16	17,59
	G1=FRV MODERADO	10	7,07	67,83	32,33	20,34
	G2=ENFERMEDAD	4	7,92	31,18	19,59	9,91
HM	G0=NO FRV	10	5,78	62,64	34,03	19,41
	G1=FRV MODERADO	9	5,67	160,75	43,33	49,08
	G2=ENFERMEDAD	3	28,61	41,21	33,06	7,06

Tabla 5.6-III Niveles de Hsps intraleucocitarias, agrupado por 677C>T y grupo de riesgo vascular.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

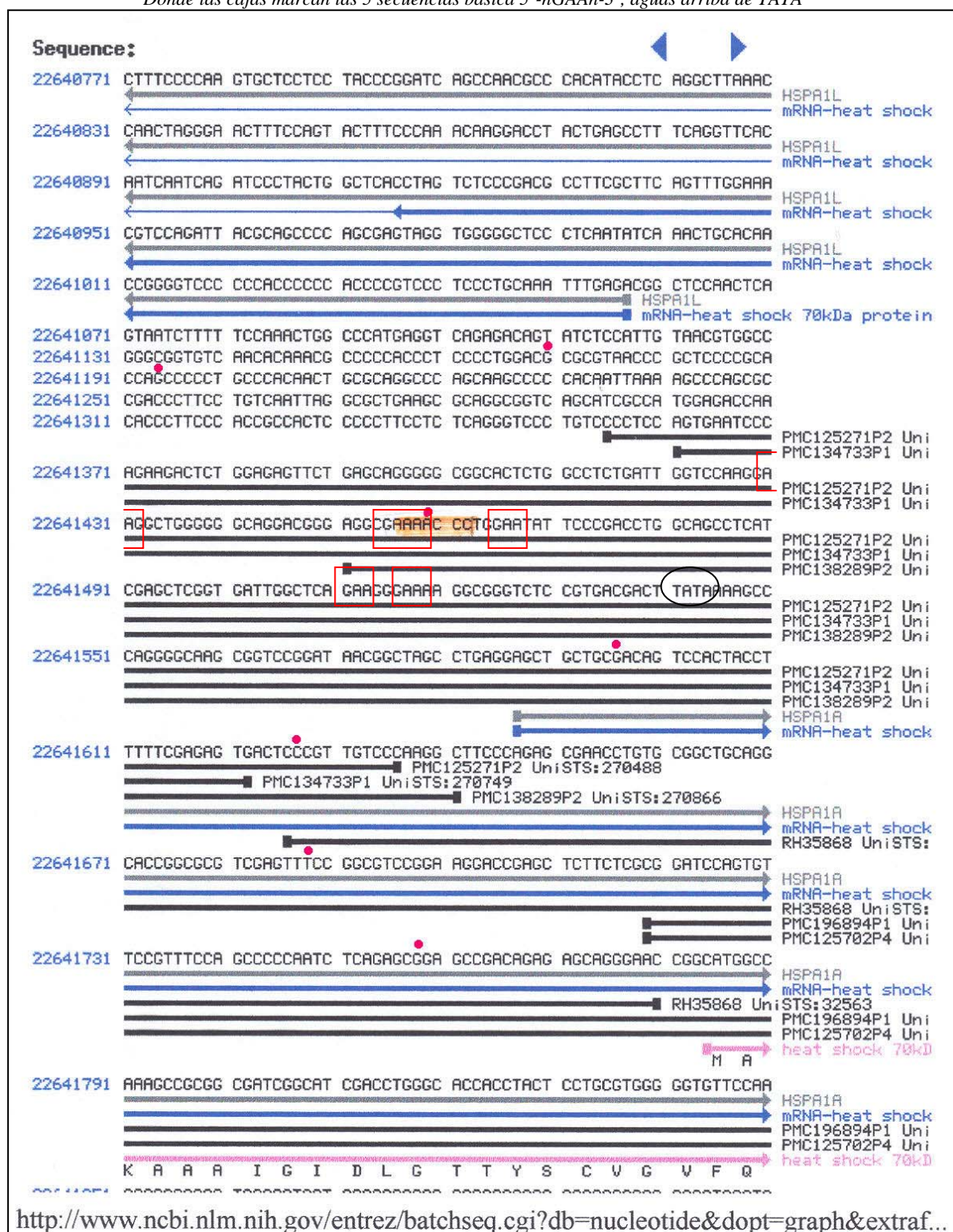


Los individuos HT para la 677 C>T, pertenecientes al G2, presentan los valores más bajos de Hsp70 intraleucocitaria, aunque no se demuestra diferencias significativas.

Para el resto de variables estudiadas (Hsp70 séricas y anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60), y al segmentar por grupo de riesgo vascular, no se ha demostrado influencia de la presencia / ausencia del polimorfismo 677C>T.

5.7 ESTUDIO MOLECULAR DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN *hsp70*

Figura 5.7-1 Secuencia del gen *hsp70-1* (HSPA1A: NT_007592) publicada en GenBank. Donde las cajas marcan las 5 secuencias básicas 5'-nGAAn-3', aguas arriba de TATA



Se destacan con punto rojo el sitio de los SNPs estudiados

En este punto se recogen los resultados obtenidos en el análisis molecular de polimorfismos del gen hsp70-1. Se ha realizado el estudio de los polimorfismos en un fragmento de 1053 pb (ver 4.15.2) que comprende el promotor y la región flanqueante 5' del gen (gi:51465675) que codifica la proteína HSPA1A, mediante 5 secuencias ensambladas (Tabla 4.15.2-I). Se han identificado 7 polimorfismos (SNPs), recogidos en la tabla 5.7-I, donde se muestra el número de nucleótido que ocupan en el gen (5'→3') y el número de nucleótido donde se produce el cambio de base, numerado (aguas arriba) a partir del triplete de iniciación ATG.

# Nucleótido en el gen	# Nucleótido SNPs
22641170	-615 G>A
22641194	-591 G>A
22641459	-326 A>C
22641596	-189 G>A
22641627	-158 C>A
22641688	-97 T>C
22641758	-27 G>C

Tabla 5.7-I SNPs encontrados en el estudio de las secuencias. Localización en el gen y cambio de bases producido

A continuación se muestran ejemplos de secuencias de aquellos casos que presentan heterocigosis para los SNPs estudiados.

➤ SNP -615 G>A

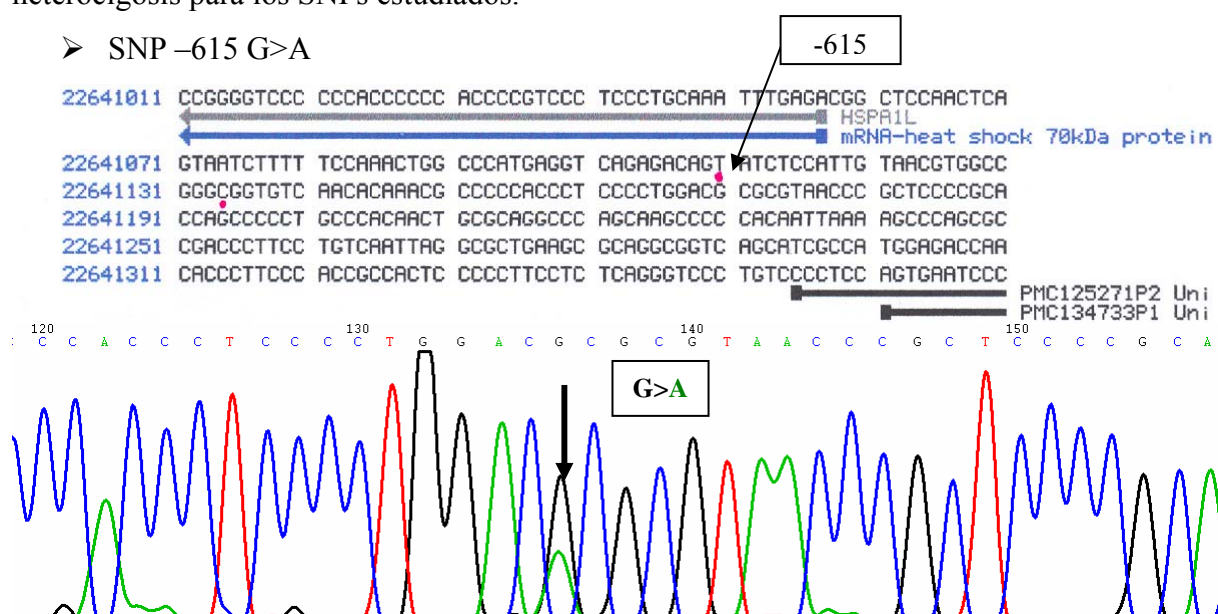


Figura 5.7-2 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641170)

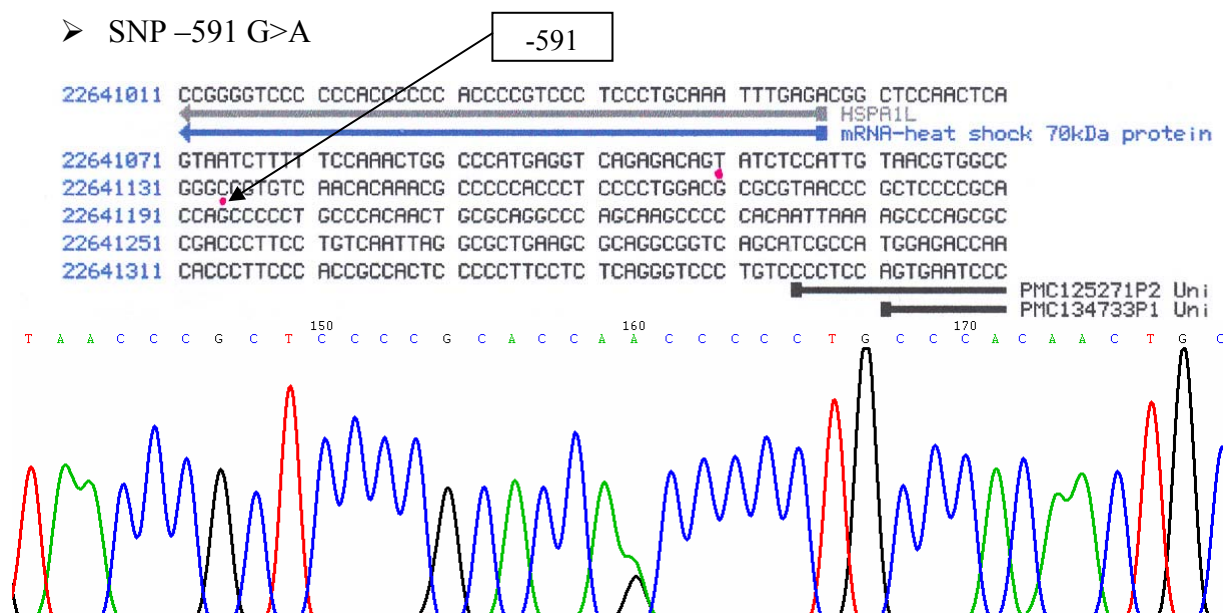


Figura 5.7-3 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641194)

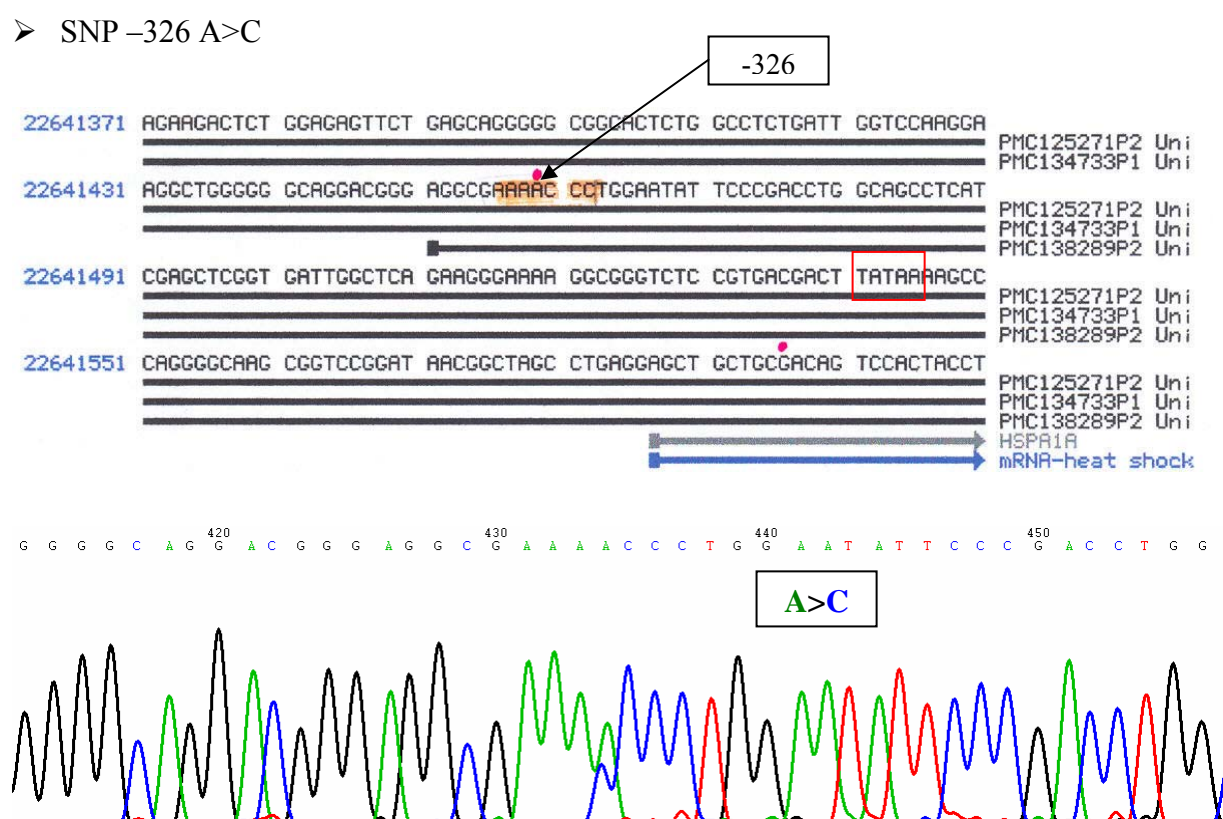


Figura 5.7-4 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641459)

➤ SNP -189 G>A

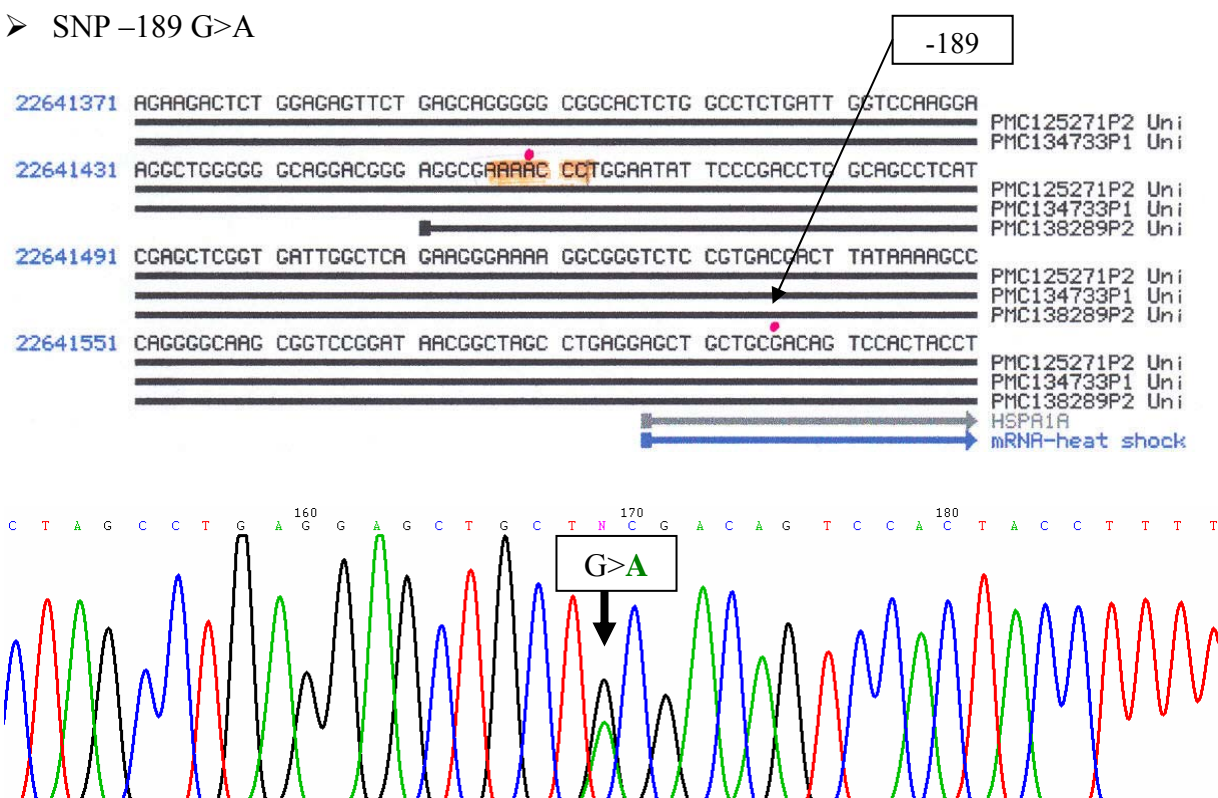


Figura 5.7-5 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641596).

➤ SNP -158 C>A

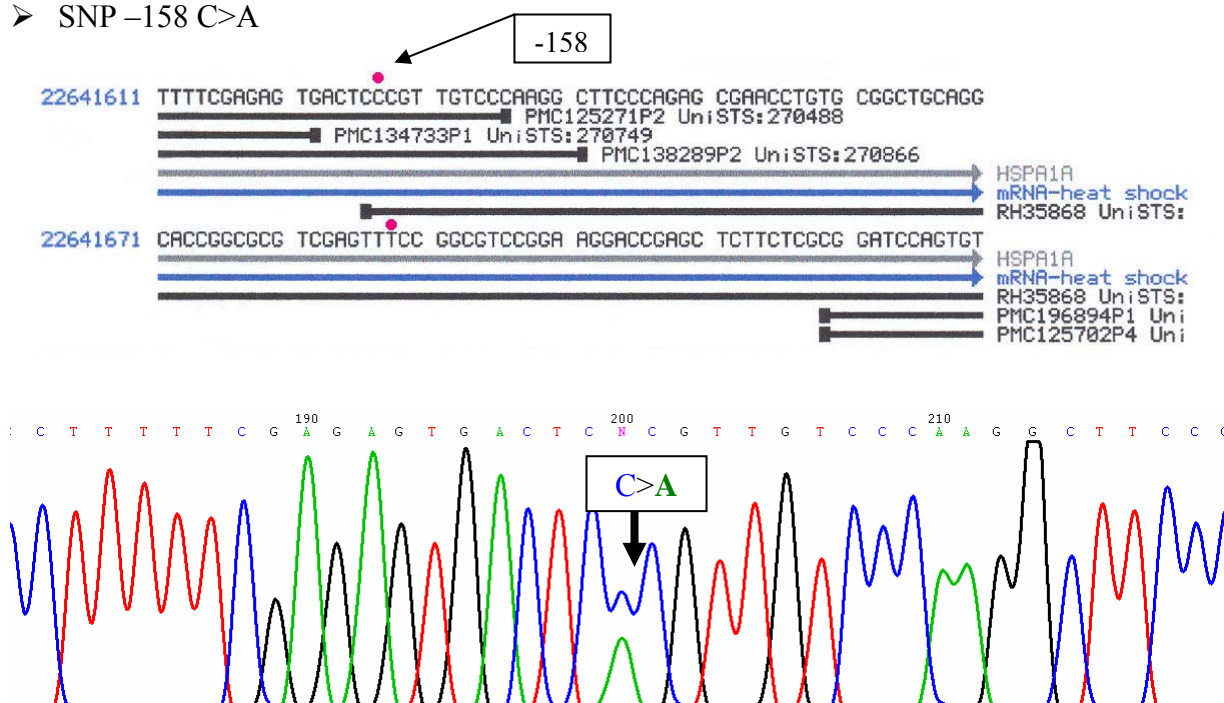


Figura 5.7-6 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641627)

➤ SNP -97 T>C

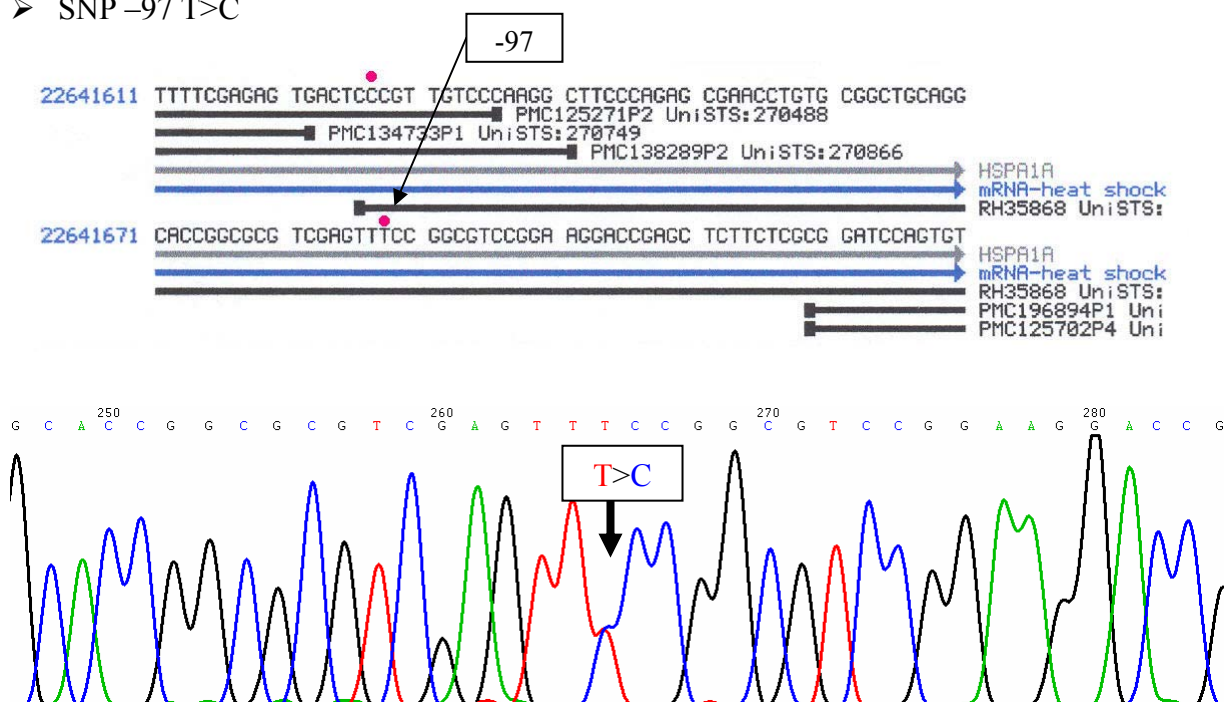


Figura 5.7-7 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641688)

➤ SNP -27G>C

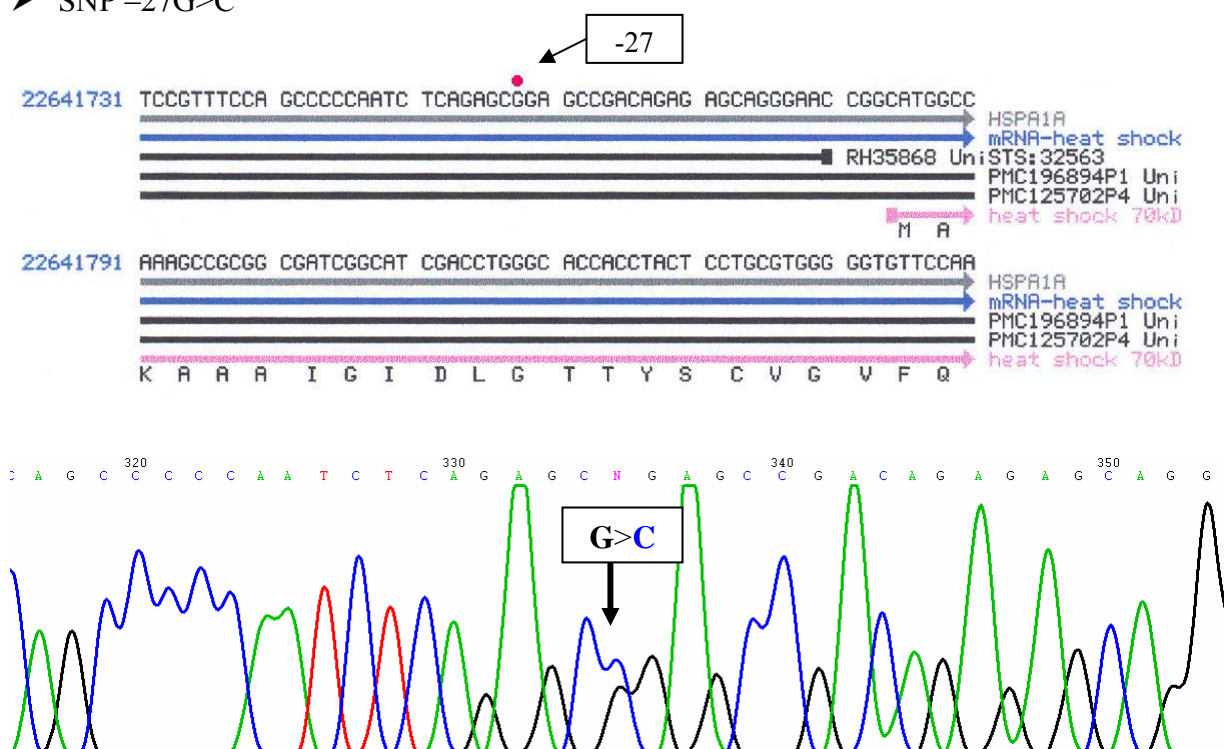


Figura 5.7-8 Secuencia en heterocigosis. Marcado con punto rojo y flecha, el cambio de base (nucleótido #22641758)

a) Población Global

En las tablas siguientes se recoge la frecuencia de aparición de los SNPs estudiados

-326 A>C	Frecuencia	%	-27 G>C	Frecuencia	%
WT	42	36,5	WT	42	36,5
HT	52	45,2	HT	53	46,1
HM	21	18,3	HM	20	17,4
Total	115	100	Total	115	100

Tabla 5.7-II Frecuencias encontrada de los SNPs -326 A>C y -27G>C.

-97 T>C	Frecuencia	%	-158 C>A	Frecuencia	%
WT	101	87,8	WT	113	98,3
HT	14	12,2	HT	2	1,7
HM	0	0	HM	0	0
Total	115	100	Total	115	100

Tabla 5.7-III Frecuencias encontrada de los SNPs -97T>C y -158 A>C.

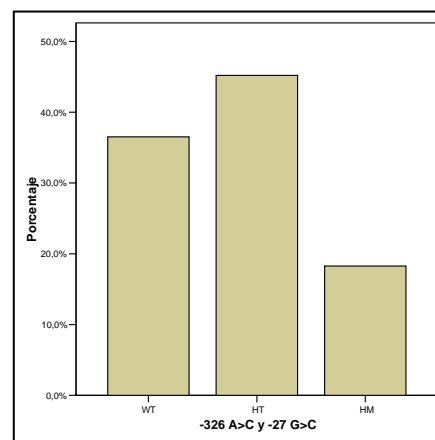


Figura 5.7-9 % de aparición de -326 A>C

-189 G>A	Frecuencia	%	-591 G>A	Frecuencia	%	-615 G>A	Frecuencia	%
WT	114	99,13	WT	110	95,6	WT	114	99,13
HT	1	0,86	HT	4	3,47	HT	1	0,86
HM	0	0	HM	1	0,86	HM	0	0
Total	115	100	Total	115	100	Total	115	100

Tabla 5.7-IV Frecuencias encontradas de los SNPs -189 G>A, -591G>A y -615G>A.

Como se observa en la tabla 5.7-II, los SNPs: -326 A>C, -27 G>C, se presentan con una frecuencia muy superior al resto de los SNPs y se coexpresan en todos los casos excepto en uno, por lo que el estudio de la influencia de estos SNPs en los capítulos siguientes se realizará conjuntamente. Ambos polimorfismos se presentan en heterocigosis en el 45,2% y 46,1% de la población, respectivamente. La frecuencia y distribución alélica observada es:

Nº Casos	Frecuencia alélica		Distribución alélica	
	p(A)	q(C)	A (AA+AC)	C (AC+CC)
115	0,59	0,41	136(59,13%)	94(40,86%)

Tabla 5.7-V Frecuencia y Distribución alélica para A y C

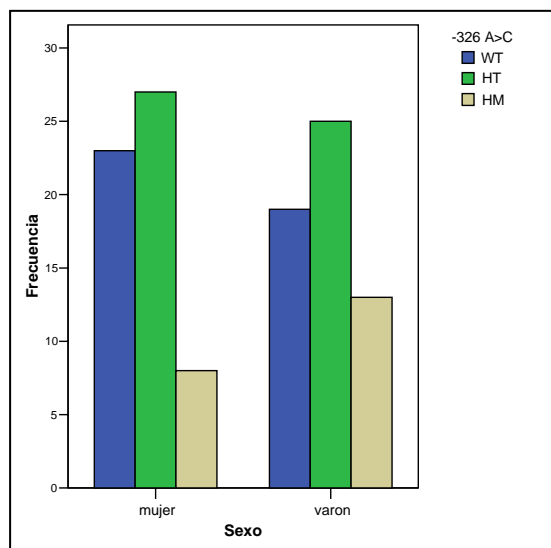
Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
	AA	AC	CC	AA	AC	CC
115	42	52	21	1,04	0,93	1,08

Tabla 5.7-VI Distribución de genotipos -326 A>C y Equilibrio Hardy-Weinberg

Para el resto de polimorfismos estudiados, dada la baja frecuencia encontrada (Tablas 5.7-III y IV), no se ha realizado análisis segmentado ni por sexo, ni por grupo de riesgo vascular.

b) Agrupado por sexo

SNPs: -326 A>C y -27 G>C



-326 A>C y -27 G>C			Frecuencia	%
Sexo	mujer	WT	23	39,6
		HT	27	46,5
		HM	8	13,8
		Total	58	100,0
	varón	WT	19	33,3
		HT	25	43,8
		HM	13	22,8
		Total	57	100,0

Tabla 5.7-VII Frecuencias de los SNPs -326 A>C y -27G>C

Donde: WT=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

	-326 A>C
U de Mann-Whitney	1473,00
W de Wilcoxon	3184,00
Z	-1,090
Sig. Asintót. (bilateral)	,276

Variable de agrupación: Sexo

Figura 5.7-10 Frecuencia de genotipos, por sexo

Pruebas de chi-cuadrado	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	1,565 ^b	1	,211	,236	,156	
Corrección por continuidad ^a	1,019	1	,313			
Razón de verosimilitud	1,577	1	,209	,236	,156	
Estadístico exacto de Fisher				,236	,156	
Asociación lineal por lineal	1,551 ^c	1	,254	,301	,156	,054
N de casos válidos	115					

(a) Calculadp sólo para una tabla de 2x2. (b) 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,41.(c) El estadístico tipificado es 1,245.

Al analizar la frecuencia de aparición del polimorfismo, agrupado por sexo, se observa que el 22,8% de los varones presentan en homocigosis la mutación (HM), frente al 13,8% del grupo de mujeres, aunque la diferencia no alcanza significación estadística. La frecuencia y distribución alélica observada para ambos sexos es:

	Frecuencia Alélica		Distribución Alélica	
	p(A)	q(C)	A (AA+AC)	C (AC+CC)
Mujeres	0,63	0,37	73 (62,93%)	43 (37,06%)
Varones	0,55	0,45	63 (55,26%)	51 (44,73%)

Tabla 5.7-VIII Frecuencia y Distribución alélica para C y T, agrupado por sexo

	Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
		AA	AC	CC	AA	AC	CC
Mujeres	58	23	27	8	1,00	1,00	1,00
Varones	57	19	25	13	1,10	1,13	1,12

Tabla 5.7-IX Distribución de genotipos -326 A>C, agrupado por sexo

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

SNPs: -326 A>C y -27 G>C

-326 A>C y -27 G>C		Frecuencia	%
G0=NO FRV	WT	31	40,8
	HT	30	39,5
	HM	15	19,7
	Total	76	100,0
G1=FRV MODERADO	WT	9	31,0
	HT	16	55,2
	HM	4	13,8
	Total	29	100,0
G2=ENFERMEDAD	WT	2	20,0
	HT	6	60,0
	HM	2	20,0
	Total	10	100,0

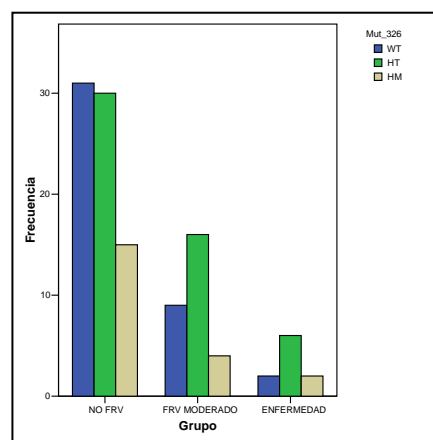


Tabla 5.7-X Frecuencias encontrada de los SNPs -326 A>C y -27G>C

Donde: WT=homocigoto normal (wild type)

HT=heterocigoto

HM=homocigoto mutado

Figura 5.7-11 % de genotipos, por sexo

Pruebas de chi-cuadrado	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	,327 ^b	1	,567	,621	,382	
Corrección por continuidad ^a	,100	1	,751			
Razón de verosimilitud	,334	1	,563	,621	,382	
Estadístico exacto de Fisher				,621	,382	
Asociación lineal por lineal	,324 ^c	1	,430	,621	,382	,176
N de casos válidos	115					

(a) Calculado sólo para una tabla de 2x2. (b) 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 7,12.(c) El estadístico tipificado es -,569.

Al fragmentar por grupo de riesgo, se observa que en el grupo G0, sin factores de riesgo vascular, el genotipo CC (HM) aparece con la menor frecuencia (19,7%), mientras que el genotipo salvaje AA (wild type) y el genotipo AC (HT) aparecen en porcentajes similares (40,8% y 39,5%), aunque las diferencias no alcanzan significación estadística. La frecuencia y distribución alélica encontrada para los diferentes genotipos en los distintos grupos de riesgo vascular es la siguiente:

SNP -326 A>C	Frecuencia Alélica		Distribución Alélica	
	p(A)	q(C)	A (AA+AC)	C (AC+CC)
G0=NO FRV	0,60	0,40	92(60,52%)	60(39,47%)
G1=FRV MODERADO	0,59	0,41	34(58,62%)	24(41,37%)
G2=ENFERMEDAD	0,50	0,50	10(50,0%)	10(50,0%)

Tabla 5.7-XI Frecuencia y Distribución alélica para A y C, por grupo de riesgo vascular

	Nº Casos	Genotipo			Observado/Esperado		
		AA	AC	CC	AA	AC	CC
G0=NO FRV	76	31	30	15	1,13	0,82	1,23
G1=FRV MODERADO	29	9	16	4	0,89	1,14	0,82
G2=ENFERMEDAD	10	2	6	2	0,80	1,20	0,80

Tabla 5.7-XII Frecuencia y Distribución alélica para A y C, por grupo de riesgo vascular

5.8 INFLUENCIA DE LOS SNPs DEL PROMOTOR DEL GEN *hsp70* EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, HOMOCISTEÍNA y PROTEÍNA C REACTIVA (Objetivo 3.4)

5.8.1 SNPs -326 A>C y -27 G>C

➤ Influencia sobre Hsp70i intraleucocitaria

Hsp70iPMNs (ng/ug proteína)					
-326 A>C y -27 G>C	N	Mín	Máx	Media	s
WT	42	4,64	74,63	32,64	18,02
HT	52	2,62	160,75	32,66	26,52
HM	21	7,07	48,36	25,76	12,93

Tabla 5.8.1-I [Hsp70iPMNs] agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

En el conjunto de la población, los sujetos que presentan las mutaciones -326 A>C y -27G>C en homocigosis, presentan los valores más bajos de Hsp70 intraleucocitaria, que aunque no alcanza significación estadística (Kruskal-Wallis: $p=0,434$), constituye una importante significación biológica.

Al segmentar la población por **genotipo y sexo**, se observan diferencias próximas a la significación (U Mann Witney $p=0,070$) entre ambos sexos, en el grupo que presentan en homocigosis la mutación.

Hsp70iPMNs (ng/ug proteína)						
-326 A>C y -27 G>C	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	mujer	23	4,64	74,63	32,12	20,39
	varon	19	10,26	59,76	33,28	15,19
HT	mujer	27	4,96	74,91	32,77	20,11
	varon	25	2,62	160,75	32,55	32,50
HM	mujer	8	19,18	48,36	31,47	10,77
	varon	13	7,07	45,74	22,24	13,26

Tabla 5.8.1-II [PMNs] agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C y sexo. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Prueba comparación muestras independientes Mann-Whitney		
-326 A>C y -27 G>C		HSP70iPMNs
HM	U de Mann-Whitney	27,000
	W de Wilcoxon	118,000
	Z	-1,811
	Sig. asintót. (bilateral)	,070
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,076(a)

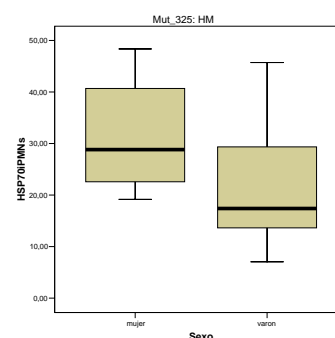


Figura 5.8.1-I [PMNs] agrupado por sexo y con SNPs -326 A>C y -27 G>C: HM

Al segmentar la población por **genotipo y grupo de riesgo vascular**, se demuestra que la menor [Hsp70i] intraleucocitaria en el grupo HM para -326 A>C y -27G>C ocurre debido a los sujetos con factores de riesgo vascular de los grupos G1 y G2, que aunque no alcanza diferencias significativas, tiene importancia biológica. Los sujetos heterocigotos para ambos SNPs alcanzan las mayores concentraciones.

<i>Hsp70iPMNs (ng/ug proteína)</i>						
-326 A>C, -27 G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	4,64	74,63	32,51	19,44
	G1=FRV MODERADO	9	22,10	58,37	35,08	14,34
	G2=ENFERMEDAD	2	16,16	31,18	23,67	10,62
HT	G0=NO FRV	30	2,62	62,64	27,13	17,62
	G1=FRV MODERADO	16	5,67	160,75	41,93	39,83
	G2=ENFERMEDAD	6	23,11	54,28	35,59	12,07
HM	G0=NO FRV	15	11,79	48,36	28,91	13,11
	G1=FRV MODERADO	4	7,07	25,19	17,49	7,82
	G2=ENFERMEDAD	2	7,92	29,36	18,64	15,16

Tabla 5.8.1-III [Hsp70iPMNs] agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C y grupo de riesgo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

-326 A>C, -27 G>C	Grupo	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	G0=NO FRV	mujer	19	4,64	74,63	30,99	21,31
		varon	12	10,26	59,76	34,92	16,67
	G1=FRV MODERADO	mujer	3	33,04	54,34	44,58	10,76
		varon	6	22,10	58,37	30,33	14,20
	G2=ENFERMEDAD	mujer	1	16,16	16,16	16,16	.
		varon	1	31,18	31,18	31,18	.
HT	G0=NO FRV	mujer	18	4,96	54,63	26,28	16,49
		varon	12	2,62	62,64	28,41	19,87
	G1=FRV MODERADO	mujer	5	10,17	74,91	52,51	25,36
		varon	11	5,67	160,75	37,12	45,18
	G2=ENFERMEDAD	mujer	4	25,08	54,28	37,31	13,28
		varon	2	23,11	41,21	32,16	12,79
HM	G0=NO FRV	mujer	7	19,18	48,36	32,92	10,75
		varon	8	11,79	45,74	25,41	14,65
	G1=FRV MODERADO	mujer	1	21,29	21,29	21,29	.
		varon	3	7,07	25,19	16,22	9,06
	G2=ENFERMEDAD	varon	2	7,92	29,36	18,64	15,16

Tabla 5.8.1-IV [Hsp70iPMNs] agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C, grupo de riesgo y sexo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

➤ Influencia sobre HSP70i sérica

Considerando la población global, la concentración de Hsp70i sérica no se ve afectada por la presencia/ausencia de la mutación, presentando valores similares en los 3 grupos. Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis, se demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,861$).

<i>Hsp70i suero (ng/mL)</i>					
-326 A>C, -27 G>C	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	42	0,19	7,54	1,67	1,29
HT	52	0,23	4,03	1,66	0,95
HM	21	0,33	2,95	1,61	0,66

Tabla 5.8.1-V [Hsp70i] sérica por SNPs -326 A>C y -27 G>C.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Al segmentar la población por genotipo y sexo, no se observan diferencias estadísticamente significativa entre grupos para la [Hsp70i] sérica

Por el contrario, al segmentar la población por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observa (Tabla 5.8.1-V) que la menor [HSP70i] sérica se presenta en el grupo G2 *wild type* para la mutación, pero que no alcanza significación estadística, debido probablemente al pequeño tamaño muestral.

<i>Hsp70i suero (ng/mL)</i>						
-326 A>C, -27 G>C	Grupo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	0,19	4,22	1,55	0,91
	G1=FRV MODERADO	9	0,57	7,54	2,30	2,15
	G2=ENFERMEDAD	2	0,31	0,89	0,60	0,41
HT	G0=NO FRV	30	0,23	4,03	1,78	1,03
	G1=FRV MODERADO	16	0,59	3,33	1,43	0,84
	G2=ENFERMEDAD	6	0,77	2,73	1,66	0,80
HM	G0=NO FRV	15	0,33	2,95	1,67	0,68
	G1=FRV MODERADO	4	0,96	2,66	1,42	0,82
	G2=ENFERMEDAD	2	1,34	1,76	1,55	0,29

Tabla 5.8.1-VI [Hsp70i] sérica por SNPs -326 A>C y -27 G>C y grupo de riesgo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

➤ Influencia sobre anticuerpos anti-Hsp70i circulantes

<i>Ac. anti-Hsp70i circulantes (µg/mL)</i>					
-326 A>C, -27 G>C	N	Mín	Máx	Media	S
WT	42	234,30	1061,59	554,49	209,74
HT	52	201,53	1632,41	591,72	279,81
HM	21	251,30	1450,12	675,54	347,08

Tabla 5.8.1-VII [Anti-Hsp70i] circulantes, agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Los sujetos que presentan ambas mutaciones -326 A>C y -27 G>C en homocigosis (HM) presentan los valores más altos de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, que aunque no alcanza significación estadística (Kruskal-Wallis: $p=0,481$), es de clara significación biológica.

Al segmentar por genotipo y grupo de riesgo vascular, se observa que los valores más bajos de anticuerpos anti-Hsp70 se encuentran en el grupo WT para ambas mutaciones, con diferencias próxima a la significación estadística (Kruskal-Wallis: $p=0,159$), a excepción del grupo G2 en HM que presenta el valor menor.

<i>Ac. anti-Hsp70 circulantes (µg/mL)</i>						
-326 A>C, -27 G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	303,71	1061,59	587,93	218,49
	G1=FRV MODERADO	9	234,30	669,22	437,07	154,52
	G2=ENFERMEDAD	2	460,86	668,28	564,57	146,66
HT	G0=NO FRV	30	201,53	1358,05	561,40	270,68
	G1=FRV MODERADO	16	245,72	1632,41	617,20	311,84
	G2=ENFERMEDAD	6	513,39	1180,60	675,40	256,77
HM	G0=NO FRV	15	251,30	1339,63	697,07	317,47
	G1=FRV MODERADO	4	307,33	1450,12	715,55	520,59
	G2=ENFERMEDAD	2	267,91	600,11	434,01	234,90

Tabla 5.8.1-VIII [anti-Hsp70i]circulantes, por SNPs -326 A>C y -27 G>C y grupo de riesgo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

➤ Influencia sobre anticuerpos anti-Hsp60 circulantes

<i>Ac. anti-Hsp60 circulantes (µg/mL)</i>					
-326 A>C, -27 G>C	N	Mín.	Máx.	Media	S
WT	42	10,01	217,88	54,19	42,84
HT	52	11,15	346,50	64,63	61,47
HM	21	16,61	308,55	68,02	80,46

Tabla 5.8.1-IX [anti-Hsp60] circulantes, agrupado por SNPs -326 A>C y -27 G>C.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Los sujetos homocigotos mutados (HM) para los SNPs -326 y -27, presentan la mayor concentración de anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, mientras que la menor concentración corresponde al grupo WT, sin que alcance diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis: $p=0,887$).

Al segmentar por genotipo y sexo se observa que las mujeres presentan concentraciones circulantes de anticuerpo anti-Hsp60 superiores al grupo de varones, cuando ambos SNPs están presentes en heterocigosis (HT) y especialmente en homocigosis (HM), pero que no alcanza significación estadística, lo que habrá que confirmar con un tamaño muestral mayor.

<i>Ac. anti-Hsp60 circulantes (µg/mL)</i>						
-326 A>C, -27 G>C	Sexo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	mujer	23	10,01	150,55	54,46	40,27
	varon	19	19,42	217,88	53,87	46,89
HT	mujer	27	11,15	346,50	72,85	67,52
	varon	25	13,78	253,43	55,75	54,16
HM	mujer	8	16,61	294,47	83,10	89,89
	varon	13	17,77	308,55	58,73	76,36

Tabla 5.8.1-X [anti-Hsp60] circulantes, por SNPs -326 A>C y -27 G>C y sexo.
Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

Al segmentar por grupo de riesgo vascular, se observa que la mayor concentración de anticuerpos circulantes se encuentran en el G0 sin factores de riesgo vascular, independiente del genotipo para los SNPs, pero que el en grupo de HT arroja diferencias más marcadas (Kruskal-Wallis: $p=0,221$).

<i>Ac. anti-Hsp60 circulantes ($\mu\text{g/mL}$)</i>						
-326 A>C, -27 G>C	Grupo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	10,01	217,88	58,43	47,79
	G1=FRV MODERADO	9	22,88	97,59	44,01	22,98
	G2=ENFERMEDAD	2	23,67	44,89	34,28	15,00
HT	G0=NO FRV	30	12,65	346,50	76,98	72,43
	G1=FRV MODERADO	16	11,15	155,57	50,18	44,07
	G2=ENFERMEDAD	6	33,97	54,42	41,40	7,71
HM	G0=NO FRV	15	16,61	308,55	76,99	93,53
	G1=FRV MODERADO	4	17,77	87,74	44,05	30,32
	G2=ENFERMEDAD	2	46,48	50,81	48,64	3,06

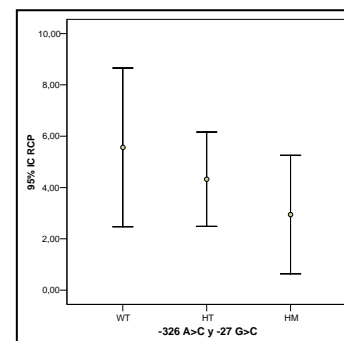
Tabla 5.8.1-XI [anti-Hsp60]circulantes, por SNPs -326 A>C y -27 G>C y grupo de riesgo. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

➤ Influencia sobre los niveles de PCR

Se observa que en la población global, la mayor concentración de PCR se presenta en el grupo WT para ambos SNPs, con valores mínimos para el grupo que presenta en homocigosis las mutaciones.

PCR					
-326 A>C, -27 G>C	N	Mín.	Máx	Media	s
WT	42	,07	52,22	5,56	9,92
HT	52	,16	40,14	4,32	6,59
HM	21	,01	21,22	2,94	5,07

Tabla 5.9-I [PCR]plasmática, agrupado por genotipo de SNPs -326 A>C y -27 G>C. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado



Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis, se demuestra que las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,047$) y que se producen entre los grupos HT y HM ($p=0,013$).

Prueba de Kruskal-Wallis	PCR
Chi-cuadrado	6,130
gl	2
Sig. asintót.	,047

Variable de agrupación: -326 A>C

	PCR
U de Mann-Whitney	343,000
W de Wilcoxon	574,000
Z	-2,474
Sig. asintót. (bilateral)	,013

Al agrupar por genotipo y sexo, no se observan diferencias en los niveles de PCR.

Al agrupar por genotipo y factor de riesgo vascular, se observa que igual que en la población global, la menor concentración de PCR se presenta en los grupos con homocigosis en los SNPs estudiados y dentro de cada genotipo presenta la menor concentración los del G0 sin factores de riesgo.

PCR						
-326 A>C, -27 G>C	Grupo	N	Mín	Máx	Media	s
WT	G0=NO FRV	31	,07	13,99	2,44	2,92
	G1=FRV MODERADO	9	,26	52,22	14,83	17,31
	G2=ENFERMEDAD	2	1,67	22,70	12,18	14,87
HT	G0=NO FRV	30	,16	6,64	2,01	1,41
	G1=FRV MODERADO	16	1,30	16,38	4,09	3,65
	G2=ENFERMEDAD	6	4,74	40,14	16,51	13,47
HM	G0=NO FRV	15	,01	7,28	1,55	1,72
	G1=FRV MODERADO	4	,83	12,82	4,04	5,86
	G2=ENFERMEDAD	2	1,17	21,22	11,19	14,17

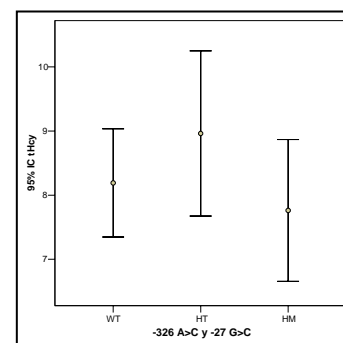
Tabla 5.9-II [RCP]plasmática, por SNPs -326 A>C y -27 G>C y grupo de riesgo vascular. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado

➤ Influencia sobre los niveles de tHcy

Se observa que en la población global, el grupo HT presenta los valores más altos, mientras que los HM para ambas mutaciones presenta los valores más bajos de homocisteína.

<i>tHcy</i>					
-326 A>C, -27 G>C	N	Mín.	Máx	Media	s
WT	42	4	18	8,19	2,70
HT	52	5	36	8,96	4,62
HM	21	5	14	7,76	2,42

Tabla 5.9-I [PCR]plasmática, agrupado por genotipo de SNPs -326 A>C y -27 G>C. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado



El análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas en la población general por genotipo, ni tampoco al segmentar por sexo y grupo de riesgo vascular.

5.8.2 *Influencia de los SNPs -97 T>C, -158 C>A, -189 G>A, -591 G>A y -615 G>A*

Se ha realizado el análisis de la posible influencia de estos polimorfismos sobre las HSPs y anticuerpos, pero dada la baja frecuencia de aparición encontrada para estos 5 SNPs (tablas 5.7-III y IV), los resultados obtenidos deberían ser confirmados con un tamaño muestral mayor, no habiéndose demostrado asociaciones relevantes.

Únicamente para el SNP -97 T>C, que se presenta en HT en el 12,2% de la población analizada, se observa que en ese grupo (genotipo TC) existen diferencias estadísticamente significativas para los niveles de Hsp70 sérica entre sexos, de forma que las mujeres HT presentan los valores más altos.

<i>Hsp70i suero</i>						
-97 T>C	Sexo	N	Mín.	Máx.	Media	s
WT	mujer	53	,19	3,65	1,47	,85
	varon	48	,57	7,54	1,81	1,22
HT	mujer	5	1,29	4,03	2,59	1,00
	varon	9	,33	2,57	1,42	,72

-97 T>C		HSP70suero
WT	U de Mann-Whitney	1069,000
	W de Wilcoxon	2500,000
	Z	-1,381
	Sig. asintót. (bilateral)	,167
HT	U de Mann-Whitney	7,000
	W de Wilcoxon	52,000
	Z	-2,067
	Sig. asintót. (bilateral)	,039
	Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,042(a)

Variable de agrupación: Sexo

Tabla 5.8.2-I [Hsp70i]sérica por SNPs -97 T>C y sexo. Donde: WT=homocigoto normal (wild type), HT=heterocigoto y HM=homocigoto mutado. Test de Wilcoxon y U de Mann-Witney

5.9 INFLUENCIA DE LOS SNPs -326 A>C, -27 G>C EN LA RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (*Hsps* y ANTICUERPOS anti-*Hsps*), HOMOCISTEÍNA Y PROTEÍNA C REACTIVA

En este apartado se presenta la influencia que la presencia /ausencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70-1* ejerce sobre la relación descrita en el apartado 5.3 de este capítulo, siguiendo el mismo esquema de agrupación. Solo se presentan aquellas correlaciones que alcanzan significación estadística, así como las que implican interés biológico.

a) Población Global

			-326 A>C:WT	-326 A>C:HT	-326 A>C:HM
<i>Rho de Spearman</i>		tHcy	tHcy	tHcy	tHcy
Anti-Hsp60	Coefficiente de correlación	-,106	,115	-,366**	,156
	Sig. (bilateral)	,257	,469	,008	,500
	N	115	42	52	21

Tabla 5.9-I . *Rho de Spearman para correlación entre [tHcy] y [Anti-spP70]. En zona sombreada -326 A>C y -27 G>C*

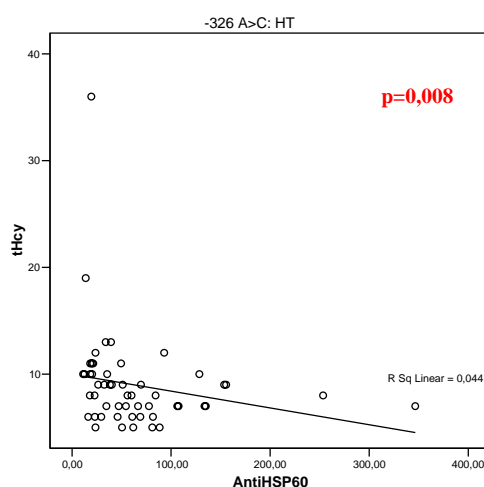


Figura.5.9-1 Correlación obtenida entre [tHcy] y anticuerpos anti-HSP60

Aunque no se demuestra en la población global correlación entre los niveles de anticuerpos anti-Hsp60 y tHcy, al agrupar por genotipo se observa correlación inversa en el grupo que presenta la mutación en heterocigosis y que alcanza significación estadística.

b) Agrupado por Sexo

Se realiza correlación bivariada entre tHcy total y los niveles de Hsp70i intraleucocitaria y sérica, y niveles de anticuerpos circulantes anti-Hsp70 y anti-Hsp60 agrupado por genotipo (zona sombreada de la tabla) y sexo.

Varón			-326 A>C:WT	-326 A>C:HT	-326 A>C:HM
Rho de Spearman		tHcy	tHcy	tHcy	tHcy
AntiHsp60	Coefficiente de correlación	-,152	,023	-,540**	,396
	Sig. (bilateral)	,260	,925	,005	,181
	N	57	19	25	13

**La correlación es significativa al nivel 0,001 (bilateral).

Tabla 5.9-II Rho de Spearman. Correlación entre [tHcy] y [anti-Hsp60]. En zona sombreada -326 A>C y -27 G>C

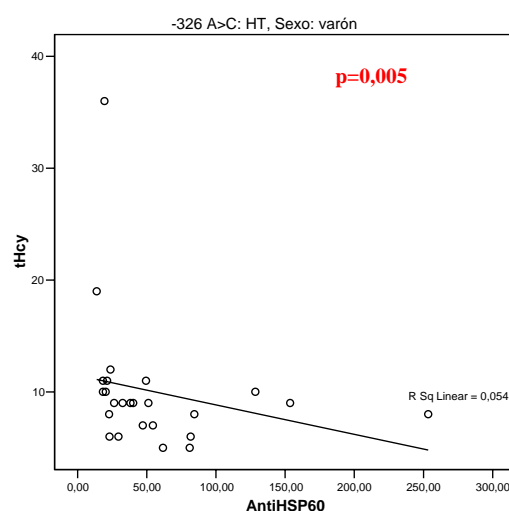


Figura.5.9-2 Correlación obtenida entre [tHcy] y anticuerpos anti-HSP60, en varones HT (-326 A>C)

Se observa que la correlación obtenida en la población global, entre [tHcy] y anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, se produce a expensas del grupo de los varones heterocigotos para la mutación -326 A>C, con alta significación estadística

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

Se realiza correlación bivariada entre tHcy total y los niveles de Hsp70i intraleucocitaria y sérica, y niveles de anticuerpos circulantes anti-HSP70 y anti-Hsp60 en la población agrupada por riesgo vascular y genotipo (zona sombreada de la tabla). Se obtiene el coeficiente Rho de Spearman. Se presentan las tablas de los grupos con significación estadística

G1=FRV MODERADO			-326 A>C:WT	-326 A>C:HT	-326 A>C:HM
Rho de Spearman		tHcy	tHcy	tHcy	tHcy
AntiHsp70	Coefficiente de correlación	,522(**)	,433	,538(*)	,800
	Sig. (bilateral)	,004	,233	,032	,200
	N	29	9	16	4

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 5.9-III . Rho de Spearman para correlación entre [tHcy] y [Anti-HSP70]. En zona sombreada -326 A>C y -27 G>C

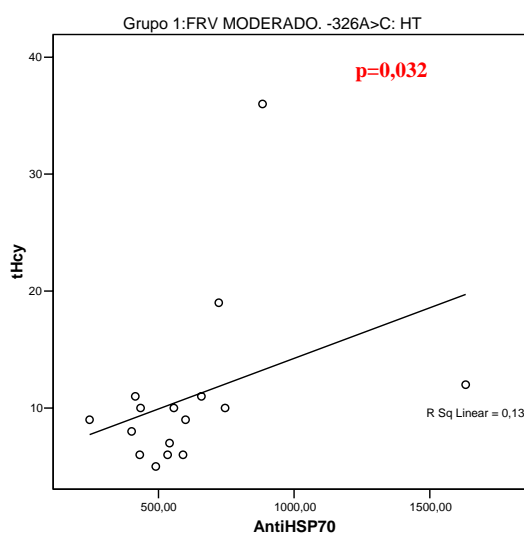


Figura.5.9-3 Correlación obtenida entre [tHcy] y anticuerpos anti-Hsp60, en G! HT (-326 A>C)

Analizada la población por genotipo y factores de riesgo vascular, se observa correlación estadísticamente significativa ($p=0,004$) entre [tHcy] y [anti-Hsp70] circulantes (ver 5.3), y que alcanza significación ($p=0,032$) en el grupo HT para la mutación -326 A>C.

d) Por Grupo de Riesgo Vascular, Sexo y -326 A>C

Se ha realizado correlaciones no paramétricas para obtener las posibles relaciones entre tHcy y proteínas de choque térmico, teniendo en cuenta el grupo de riesgo vascular, sexo y presencia del polimorfismo -326 A>C. Se han encontrado las siguientes correlaciones:

Grupo	Sexo	-326 A>C			Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
G0	mujer	WT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,068	-,377	,198	,266
				Sig. (bilateral)	,783	,111	,416	,270
				N	19	19	19	19
	varón	HM	tHcy	Coefficiente de correlación	-,698	-,239	,551	-,257
				Sig. (bilateral)	,081	,606	,200	,578
				N	7	7	7	7
		HT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,018	,504	-,211	-,307
				Sig. (bilateral)	,956	,095	,511	,331
				N	12	12	12	12
G1	varón	WT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,759	,030	,516	,638
				Sig. (bilateral)	,080	,954	,295	,173
				N	6	6	6	6
		HT	tHcy	Coefficiente de correlación	-,155	,274	,662(*)	-,690(*)
				Sig. (bilateral)	,649	,415	,026	,019
				N	11	11	11	11

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 5.9-IV . Rho de Spearman para correlación entre Hsps y [tHcy], segmentado por grupo de riesgo vascular, sexo y mutación -326 A>C.

- Directa entre [tHcy] y [anti-Hsp70] circulantes en varones del G1 que son HT para la -326 A>C (AC), n=11 (p=0,026)
- Inversa entre [tHcy] y [anti-Hsp60] en varones del G1 y HT para la -326 A>C, n=11 (p=0,019)

5.10 RELACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO y ANTICUERPOS ANTI-Hsps EN LA ATEROSCLEROSIS (Objetivo 3.5)

a) Población general

Rho de Spearman		AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	-,093	-,228(*)
	Sig. (bilateral)	,323	,014
	N	115	115
Hsp70 suero	Coefficiente de correlación	-,174	-,031
	Sig. (bilateral)	,064	,740
	N	115	115

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 5.10-I . Rho de Spearman para correlación entre Hsps

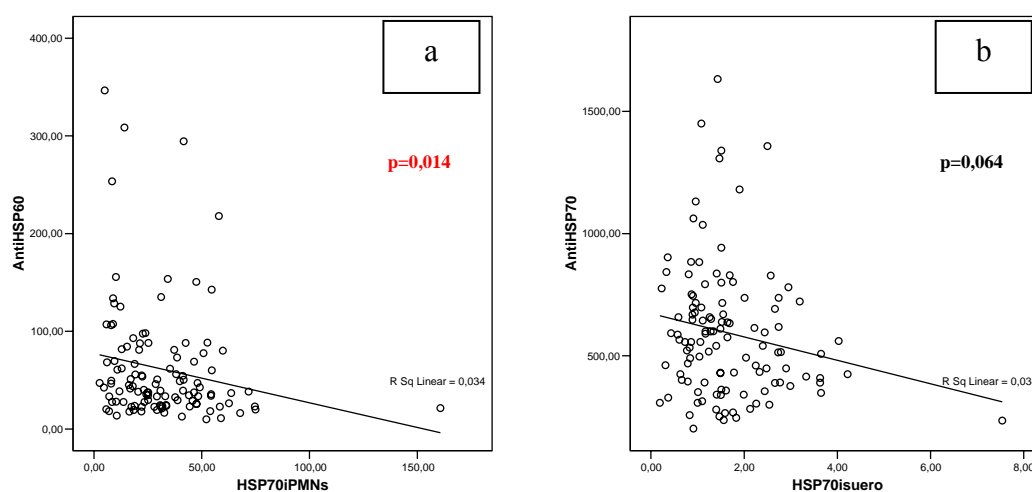


Figura.5.10-1 Correlación obtenida entre: a)[Hsp70i PMNs y anticuerpos anti-HSP60 y b)HSP70 sérica y anticuerpos anti-Hsp70

Al estudiar la influencia de los polimorfismos, se demuestra correlación inversa, estadísticamente significativa ($p=0,005$) entre [Hsp70i] intraleucocitarias y anticuerpos anti-Hsp60, a expensas del grupo HT para la -326 A>C

SNPs	Rho de Spearman		AntiHsp70	AntiHsp60
-326 A>C: HT	Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	-,020	-,383(**)
		Sig. (bilateral)	,888	,005
		N	52	52

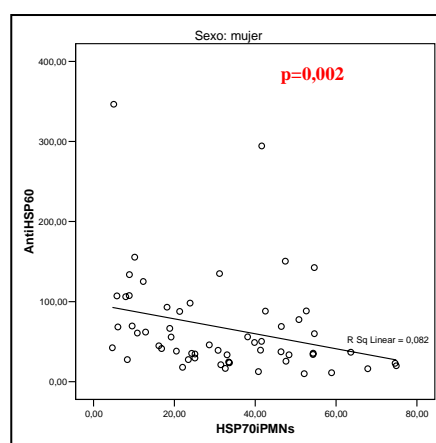
** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

b) Agrupado por sexo

En el grupo de mujeres se observa una correlación inversa, estadísticamente significativa ($p=0,002$) entre [Hsp70] intracelular y anticuerpos circulantes anti-Hsp60.

<i>Mujer</i>		AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	-,396(**)
	Sig. (bilateral)	,002
	N	58

** La correlación es significativa al nivel 0,001 (bilateral).



Al segmentar la población por sexo y genotipo -326 A>C, se demuestran las siguientes correlaciones:

En el grupo de los varones: Inversa y significativa ($p=0,019$) entre [Hsp70] sérica y anticuerpos anti-Hsp60 en el grupo WT.

En el grupo de las mujeres: 1) inversa y significativa ($p=0,001$) entre [Hsp70] en PMNs y anticuerpos circulantes anti-Hsp60, en el grupo HT y 2) inversa y significativa ($p=0,021$) entre [Hsp70] séricas y [anti-Hsp60] en el grupo HM.

-326 A>C	Sexo	Rho de Spearman	AntiHsp60
WT	varón	Hsp70isuerdo Coeficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,533* ,019 19
HT	mujer	Hsp70iPMNs Coeficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,617(*) ,001 27
HM	mujer	Hsp70isuerdo Coeficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,786(*) ,021 8

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

c) Por Grupo de Riesgo Vascular

<i>G0: NO FRV</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
AntiHsp70	Coefficiente de correlación	-,093	-,149	1,000	,251(*)
	Sig. (bilateral)	,425	,198	.	,029
	N	76	76	76	76

<i>G1: FRV MODERADO</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	1,000	,131	-,245	-,323
	Sig. (bilateral)	.	,498	,201	,087
	N	29	29	29	29

<i>G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	1,000	,576	,588	-,285
	Sig. (bilateral)	.	,082	,074	,425
	N	10	10	10	10

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

-326 A>C	Grupo	<i>Rho de Spearman</i>		Hsp70iPMNs	AntiHsp70
WT	G1=FRV MODERADO	AntiHsp60	Coefficiente de correlación	-,750*	
			Sig. (bilateral)	,020	
			N	9	
HT	G0=NO FRV	AntiHsp60	Coefficiente de correlación		,497(**)
			Sig. (bilateral)		,005
			N		30

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En la mayoría de las situaciones se observa una correlación inversa entre anticuerpos anti-Hsp60 y Hsp70 PMNs

d) Por grupo de Riesgo Vascular y Sexo

Se presentan los resultados obtenidos para Hsps y anticuerpos anti-Hsps, al segmentar por grupo de riesgo y sexo, así como las correlaciones que alcanzan significación estadística.

Grupo	Sexo	N	Hsp70 PMNs				Hsp70 suero			
			Mín.	Máx.	Media	s	Mín	Máx	Media	s
NO FRV (G0)	mujer	44	4,64	74,63	29,37	17,91	,19	4,03	1,59	,95
	varon	32	2,62	62,64	30,10	17,41	,33	4,22	1,77	,87
FRV MODERADO (G1)	mujer	9	10,17	74,91	46,40	21,30	,90	3,33	1,58	,76
	varon	20	5,67	160,75	31,95	34,51	,57	7,54	1,75	1,61
ENFERMEDAD (G2)	mujer	5	16,16	54,28	33,08	14,89	,31	2,40	1,25	,86
	varon	5	7,92	41,21	26,55	12,27	,89	2,73	1,60	,70

Tabla 5.10-II . Hsp70 intracelular y sérica, por grupo de riesgo vascular y sexo

Las mujeres pertenecientes a grupos de riesgo vascular (G1 y G2) presentan niveles de Hsp70 intracelulares superiores a los varones, especialmente en el G1 para las que la diferencia alcanza significación estadística ($p=0,048$ U Mann-Whitney). Sin embargo en el grupo sin riesgo vascular no se observa diferencias.

A lo largo de los grupos de riesgo vascular, las mujeres presentan niveles de Hsp70 circulantes inferiores a los varones, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística.

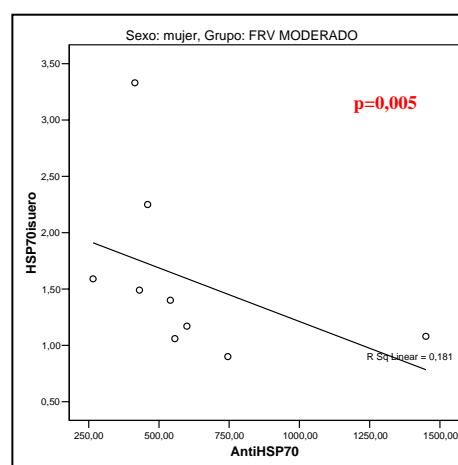
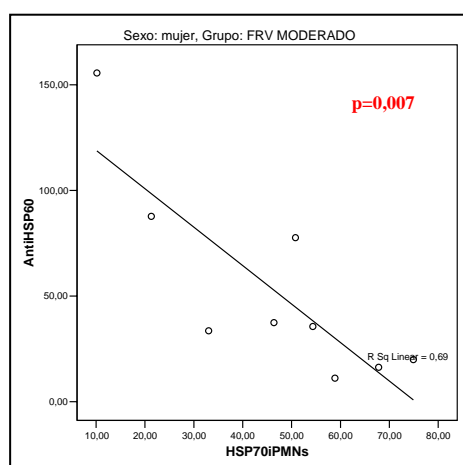
Con respecto a los niveles de anticuerpos circulantes, las mujeres de los grupos de riesgo G1 y G2, presentan niveles de anticuerpos anti-Hsp70 superiores a los varones, lo que es más relevante en el G2, sin que existan diferencias significativas. Sin embargo para los anticuerpos anti-Hsp60 esta tendencia se invierte en el grupo de enfermedad G2, de forma que las mujeres presentan niveles inferiores a los varones, aunque no hay diferencias significativas.

Grupo	Sexo	N	Anticuerpos Anti-Hsp70				Anticuerpos Anti-Hsp60			
			Mín	Máx	Media	s	Mín	Máx	Media	s
NO FRV (G0)	mujer	44	201,53	1358,05	590,83	251,65	10,01	346,50	72,97	66,94
	varon	32	251,30	1339,63	610,23	279,88	18,26	308,55	64,53	70,80
FRV MODERADO (G1)	mujer	9	265,46	1450,12	606,85	343,42	11,15	155,57	52,75	46,70
	varon	20	234,30	1632,41	560,47	306,48	13,78	128,50	45,02	31,27
ENFERMEDAD (G2)	mujer	5	460,86	1180,60	680,09	293,06	33,97	46,00	39,76	5,59
	varon	5	267,91	668,28	529,82	156,38	23,67	54,42	43,09	12,09

Tabla 5.10-III . Anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60, por grupo de riesgo vascular y sexo

Al segmentar los grupos de riesgo vascular de acuerdo al sexo, se observa las siguientes correlaciones estadísticamente significativas.

<i>Mujer y G1: FRV MODERADO</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	1,000	,167	-,417	-,817(**)
	Sig. (bilateral)	.	,668	,265	,007
	N	9	9	9	9
Hsp70 suero	Coefficiente de correlación	,167	1,000	-,833(**)	-,100
	Sig. (bilateral)	,668	.	,005	,798
	N	9	9	9	9



<i>Mujer y G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70 suero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70iPMNs	Coefficiente de correlación	1,000	,900(*)	,900(*)	-,500
	Sig. (bilateral)	.	,037	,037	,391
	N	5	5	5	5

<i>Varón y G2: ENFERMEDAD</i>		Hsp70iPMNs	Hsp70isero	AntiHsp70	AntiHsp60
Hsp70 suero	Coefficiente de correlación	,100	1,000	-,800	,900(*)
	Sig. (bilateral)	,873	.	,104	,037
	N	5	5	5	5

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

En la población sin factor de riesgo, no se demuestra correlación entre [Hsp70i] intraleucocitaria y los anticuerpos anti Hsp60 y anti Hsp70.

Las mujeres del G1 demuestran correlación significativa a nivel 0,01

5.11 CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA EXPRESIÓN DE Hsp70

Sobre la base de la hipótesis planteada en este trabajo, en la que los individuos clasificados como “hiper” productores de Hsp70, constituiría un fenotipo más sano, se ha clasificado a los individuos, de acuerdo a la distribución poblacional “normal” de Hsp70, obteniendo los percentiles P_{25} , P_{50} , P_{75} , de forma que aquellos individuos con niveles inferiores al P_{25} serían “hipo” productores, aquellos con niveles incluidos en el intervalo $P_{25} - P_{75}$, serán “normo” productores y aquellos con niveles superiores al P_{75} , se clasifican como “hiper” productores, con el objetivo de poder relacionarlo con la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR, así como con los polimorfismos estudiados en el promotor del gen *hsp70-1*. La tabla 5.11-I recoge los valores obtenidos y su clasificación.

		Clasificación	Hsp70 PMNs	Hsp70 suero
N	Válidos		115	115
Percentiles	25	HIPO	16,16	,91
	50	NORMO	28,61	1,47
	75	HIPER	44,40	2,25

Tabla 5.11-I Concentración de Hsp70 intracelular y sérica y anticuerpos anti Hsp70 y anti-Hsp60, obtenidas para los distintos percentiles.

6. *DISCUSIÓN*

6. DISCUSIÓN

Este capítulo se ha estructurado en 2 partes. Una primera (apartados 6.1-6.3) en la que se analizan y discuten conceptos y procedimientos utilizados y una segunda (apartados 6.4-6.8) en la que se discuten los resultados obtenidos, siguiendo el esquema de los objetivos planteados en el capítulo 3 de esta memoria.

6.1 *FACTORES DE RIESGO VASCULAR: CLASIFICACIÓN y CONCEPTO*

El manejo de los factores de riesgo vascular constituye una parte esencial en el cuidado, no solo de los pacientes con aterosclerosis establecida, sino de aquellos que tienen riesgo de desarrollarla.

El término “factor de riesgo” se ha utilizado no solo en referencia a un “verdadero” factor de riesgo, sino para identificar aquellos factores que poseen una mera asociación matemática con el desarrollo de la aterosclerosis.

Un “verdadero” factor de riesgo es aquel que puede ser modificado por una determinada intervención siendo capaz de reducir la probabilidad de que se presente un resultado de aterosclerosis. En el contexto que nos ocupa sería causa de aterosclerosis.

Un factor de riesgo “candidato” se considera un indicador ó característica que incrementa la probabilidad de un resultado de aterosclerosis, para el que no existe evidencia de causalidad y no se ha demostrado que su modificación disminuya la probabilidad o desarrollo de enfermedad, ni ayuda en el diagnóstico ni en la evaluación del pronóstico. Sin embargo cuando un factor de riesgo “candidato” es validado como ayuda en la evaluación pronóstica de la enfermedad, su consideración podría modificarse y pasar a ser un factor de riesgo “cualificado”¹⁷.

Por tanto si somos capaces de matizar las definiciones de factor de riesgo, podría resultar de interés y ser más fácil juzgar, cuáles tienen relevancia clínica y cuales serían solo “candidatos”.

En ocasiones, debido a la ausencia de estudios epidemiológicos descriptivos realizados bien en modelo animal o in vitro, un determinado “marcador” considerado previamente como “candidato”, podría llegar a ser considerado como un “verdadero” factor de riesgo. Los estudios descriptivos en los que se identifican asociaciones matemáticas no indican que su

valoración proporcione información adicional más allá de la que proporciona un “verdadero” factor de riesgo.

Establecer el concepto de riesgo vascular es esencial para analizar la posible relevancia clínica de un determinado marcador, entendiendo por relevancia clínica la capacidad de identificar, medir y manejar un factor de riesgo específico con el propósito de mejorar el reconocimiento de un alto riesgo individual y reducir la probabilidad de desarrollar la enfermedad o presentar eventos cardiovasculares recurrentes.

Existen una serie de marcadores (VCAM-1, IL-1, IL-8, MMP-9, adiponectina), cualificados como posibles factores de riesgo, que podrían considerarse “candidatos”, cuya relevancia clínica es importante.

La mayoría de los factores de riesgo pueden evaluarse por su utilidad clínica, de forma que se demuestre su valor para identificar, medir y manejar un determinado riesgo, con el propósito de mejorar el reconocimiento de riesgo individual, siendo capaz de reducir la probabilidad de presentar eventos recurrentes de enfermedad cardiovascular.

La evaluación de nuevos factores de riesgo debería llevar asociado el conocimiento previo del coste de la prueba, exactitud, precisión y estandarización del ensayo, información añadida a la que ya aportan los factores de riesgo verdaderos o causales y si hay consistencia de que el nuevo factor pueda predecir un futuro riesgo de aterosclerosis entre poblaciones diferente a la basal estudiada.

Desde el punto de vista de la utilidad clínica, se deben plantear una serie de cuestiones para determinar si un marcador puede ser considerado factor de riesgo³³⁷. Estas cuestiones se refieren a: ¿es un analito?, ¿añade más información a los ya establecidos como verdaderos?, ¿es estable con respecto a la dieta y la hora del día?. De forma ideal un marcador debería no solo proporcionar información independiente sobre riesgo vascular, sino ser de fácil cuantificación, económico y poder disponer de un ensayo comercial estandarizado con baja variabilidad y que no requiera extracciones sanguíneas especiales, ni metodología especializada.

En este sentido las proteínas de choque térmico (Hsps) podrían ser considerados como factores de riesgo vascular “candidatos” que una vez evaluados, pudieran pasar a la categoría de factores de riesgo “cualificados”.

6.2 INTERES FISIOPATOLÓGICO DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS

El estudio de los *factores de riesgo vascular clásicos* (colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y glucosa), proporciona información de alto interés fisiopatológico, ya que permite la implantación de una acción intervencionista con el objetivo de conseguir un efecto beneficioso en el individuo aparentemente sano.

Tradicionalmente la aterosclerosis ha sido considerada como una enfermedad debida al depósito de lípidos en la superficie de las arterias, cuyo crecimiento sería capaz de bloquear el suministro de sangre a los tejidos³³⁸, pudiendo dar lugar a eventos cardiovasculares como infarto de miocardio y/o ictus.

Debido a la relación epidemiológica establecida, la medida de colesterol es incuestionable por su indudable valor como factor de riesgo de futuros eventos cardiovasculares y por constituir uno de los principales factores de riesgo de arteriosclerosis, modificable. Clínicamente la determinación y monitorización del colesterol durante décadas ha permitido el estudio de los mecanismos de regulación del metabolismo del colesterol³³⁹. Valores elevados de colesterol-HDL protegen frente a cardiopatías coronarias, mientras que valores disminuidos del colesterol-HDL, especialmente en combinación con niveles de triglicéridos elevados, implican un alto riesgo cardiovascular. La concentración de colesterol-LDL, es la magnitud de mayor valor clínico para el pronóstico de la esclerosis coronaria. En los últimos años, ha aumentado el interés por el papel que las lipoproteínas LDL modificadas juegan en la aterosclerosis³³⁷. Como se ha descrito previamente, concentraciones elevadas de LDL en sangre durante un tiempo prolongado con una elevada tasa de modificación biológica dan lugar a trastornos de la función endotelial y una absorción elevada del colesterol-LDL por el sistema de monocitos/macrófagos y por las células musculares lisas de la pared tisular. La determinación de triglicéridos, se utiliza para el diagnóstico y seguimiento de la hiperlipemia.

La proteína C reactiva (PCR), proteína de fase aguda, es un pentámero de 120.000 Da, producida exclusivamente por el hígado, cuya síntesis está mediada por IL-6. Los niveles de PCR en individuos sanos se encuentran por debajo de 5 µg/mL. El interés de su determinación cuantitativa se debe a su importancia como marcador de inflamación aguda y necrosis tisular. Los niveles de PCR comienzan a elevarse a las 6 horas de producirse la inflamación aguda³⁴⁰. Situaciones causantes de daño y necrosis tisular, como quemaduras, cirugía mayor o infarto de miocardio, se asocian con un incremento de sus niveles en suero.

La PCR constituye un marcador clínico excelente y robusto³⁴¹. PCR es una proteína estable cuya variación diurna es despreciable y para la que se ha demostrado que no existe variaciones significativas en relación con el estado de ayuno ó no. Posee una vida media de 24 horas. Su cuantificación mediante procedimientos analíticos estandarizados, como son inmunoensayos de alta sensibilidad, es sencilla y posee una buena estabilidad.

En los últimos años, **la homocisteína plasmática** ha adquirido un gran interés clínico, ya que el aumento moderado del nivel de homocisteína plasmática, se ha considerado como un factor de riesgo vascular coronario, cerebral ó periférico “independiente” de otros factores trombogénicos convencionales. Las repercusiones clínicas de la hiperhomocisteinemia, la importancia y dependencia de vitaminas en su metabolismo, así como las implicaciones genéticas de sus enzimas, hacen que la medición de la concentración de tHcy plasmática se incluya en el estudio de aquellos pacientes que han sufrido un evento vascular.

De acuerdo con Kaul³⁴², la situación ideal para declarar la homocisteína como un factor causal de enfermedad vascular, debería basarse en 3 requerimientos: 1) Existencia de una asociación consistente, fuerte e independiente entre los niveles moderadamente elevados de homocisteína y eventos cardiovasculares, obtenidos en estudios epidemiológicos robustos, 2) Evidencia de un mecanismo coherente a través del cual la homocisteína promueva directamente aterosclerosis y 3) Demostración de la modificación del riesgo vascular basados en estudios prospectivos randomizados intervencionistas, dirigidos a la reducción de los niveles de homocisteína.

Las proteínas de choque térmico (Hsp70) constituyen una gran familia de proteínas capaces de ayudar en la respuesta celular frente al estrés agudo. La importancia de estas proteínas es evidente por el hecho de ser ubicuas y altamente conservadas a lo largo de las especies. Aunque son moléculas intracelulares, cuando se produce una sobreexpresión en respuesta al daño celular, pueden ser transportadas y residir en la membrana celular, desde donde pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico de vigilancia y funcionar como auto-antígenos, pudiendo liberarse de la célula y salir al torrente circulatorio, para ejercer su actividad biológica extracelular. Las Hsps70 poseen propiedades anti-inflamatorias y anti-apoptóticas y se les adjudica un papel cardioprotector. La presencia de niveles elevados de Hsp70 se asocia con bajo riesgo de enfermedad cardiovascular y es independiente de factores de riesgo tradicionales³⁴³. Mejoran la viabilidad de la célula muscular lisa³⁴⁴ y se han detectado en suero de sujetos normales³⁰⁷. El aumento de las Hsp70 circulantes se ha correlacionado con

una disminución del grosor de la íntima en sujetos hipertensos³¹⁰. Sin embargo el significado de la relación inversa entre aterosclerosis y Hsp70 no está bien establecida.

6.3 **PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS UTILIZADOS. LIMITACIONES y CONSIDERACIONES PREANALÍTICAS.**

➤ **Factores de riesgo vascular clásicos**

Los procedimientos analíticos utilizados para la medición de colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y glucosa, cumplen los requisitos de sensibilidad, especificidad y linealidad exigidos a un sistema analítico utilizado en la rutina diaria de un Servicio de Bioquímica Clínica, de forma que la toma de decisiones, evaluación y clasificación de los pacientes no se vea afectada por la variabilidad del método.

La imprecisión intra e interserial (%CV) de todos los procedimientos utilizados, obtenidos a dos niveles de concentración (normal y patológico) es <2,5%.

Las limitaciones de los procedimientos se refieren a interferencias en situaciones concretas de ictericia, hemólisis e hiperlipemia de la muestra sanguínea. Sin embargo no se producen interferencias por: 1) ictericia, cuando la concentración de bilirrubina conjugada <25 mg/dL y bilirrubina no conjugada < 18 mg/dL), 2) hemólisis, hasta una [Hb] 700-1000 mg/dl y 3) lipemia, hasta una [triglicéridos] entre 600- 2.500 mg/dL).

En casos aislados pueden presentarse valores falsamente elevados de colesterol-LDL a concentraciones elevadas de inmunoglobulinas. Dado que las hepatopatías influyen en el metabolismo lipídico, la utilidad diagnóstica de análisis de colesterol, colesterol-HDL y colesterol-LDL es limitada en pacientes con hepatopatías.

➤ **Proteína C reactiva**

El procedimiento analítico utilizado para la determinación de PCR es un inmunoensayo de alta sensibilidad. Las limitaciones del ensayo se refieren a sus características analíticas. Al ser un ELISA manual, presenta una variabilidad intra e interensayo (%CV>5%) superior a los procedimientos analíticos automatizados.

La linealidad del procedimiento, permite la medición de PCR en intervalos de concentración tanto en rango de normalidad, como patológico. La sensibilidad del ensayo permite la detección de una concentración mínima de 1 µ/mL.

➤ **Homocisteína plasmática**

El interés del diagnóstico clínico de hiperhomocisteinemia, ha dado lugar al desarrollo de numerosos métodos para la cuantificación de homocisteína total en plasma (tHcy).

Actualmente, la mayoría de los procedimientos analíticos existentes, están diseñados para la medición de homocisteína total, de forma que incluye homocisteína asociada a proteínas (70% de la Hcy), dipéptidos como homocistina y homocisteína-cisteína (20-30%) y homocisteína libre o reducida que representa únicamente del 2 al 4 % de la homocisteína total respectivamente. Por ello y con el objetivo de alcanzar suficiente sensibilidad, es necesario el uso de agentes reductores.

Los agentes reductores más utilizados son ditioeritritol, ditiotreitól, mercaptoetanol, hidrobórato sódico y tri-n-butilfosfina.

El procedimiento de HPLC adaptado en nuestro laboratorio, utiliza trialquilfosfina como agente reductor, con detección fluorimétrica y presenta un %CV intra e interanálisis <10% (tabla 5.2-V). Dado que la distribución de los niveles de homocisteína en la población general no sigue una distribución normal, los valores de referencia se obtienen utilizando el percentil 95, estratificando por sexo. El punto de corte por encima del cual se considera situación de hiperhomocisteinemia (HHcy) quedó establecido en 11 $\mu\text{mol/L}$ para mujeres y 14 $\mu\text{mol/L}$ en varones, considerando como valor límite deseable³⁴⁵ 10 $\mu\text{mol/L}$.

La aparición de los inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA) adaptados a equipos automáticos ha permitido su expansión, de forma que hoy en día son numerosos los laboratorios que realizan la determinación de tHcy.

Las limitaciones del procedimiento utilizado, se refieren fundamentalmente a la fase preanalítica. La producción y liberación de homocisteína por los hematíes, durante la extracción y transporte de la muestra, puede producir un aumento de los niveles plasmáticos de tHcy, dando lugar a posibles casos falsos positivos.

Para limitar al máximo la liberación de homocisteína, la muestra inmediatamente después de ser obtenida, se debe introducir en hielo, lo que permite su transporte a 4°C, pudiéndose almacenar durante 4 horas post-extracción, sin aumento de los niveles de homocisteína (<3%) clínicamente relevantes. Sin embargo el mantenimiento durante horas a Tª ambiente, conlleva un aumento del 10%, ya en la primera hora³⁴⁶.

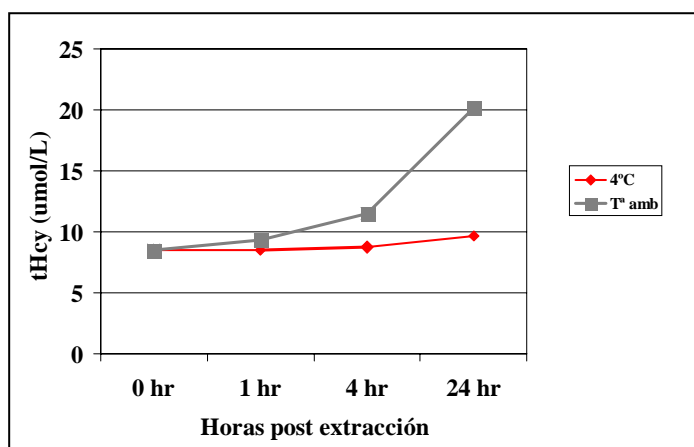


Figura 6.3-1 Efecto de la temperatura en el transporte y almacenamiento de la muestra para la medición de tHcy. Modificado de Deulofeu²³²

Se recomienda enviar al laboratorio antes de 1 hora, para minimizar el número de falsos positivos y asegurar la correcta clasificación de los individuos analizados. El plasma obtenido por centrifugación es estable durante años si se almacena a -20°C .

La variabilidad biológica intraindividual observada para los niveles de homocisteína es relativamente baja ($\%CV=7$), mientras que inter individuos es muy alta ($\%CV=33$), lo que se explica por las múltiples variables que afectan a su metabolismo³⁴⁷. La variabilidad intraindividual, junto con la variabilidad metodológica, son factores que se deben considerar en la evaluación de aquellos pacientes en seguimiento, de forma que el mínimo cambio de [tHcy] plasmática, debería ser superior al 25% para ser considerado³⁴⁸ clínicamente relevante. Las concentraciones de homocisteína no se ven alteradas significativamente tras la ingesta de alimentos, ni en las diferentes estaciones del año a pesar de los posibles cambios de dieta, ni tras la realización de un ejercicio suave¹⁰⁰.

Sin embargo, los niveles de homocisteína pueden modificarse entre la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad. En un estudio preliminar³⁴⁹ realizado en la Unidad Coronaria del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, sobre 31 pacientes (24 ♂ y 7 ♀) ingresados por infarto agudo de miocardio (IAM) de menos de 24 horas de evolución, se demuestra que en el grupo de varones, existen diferencias significativas (test de Wilcoxon $p<0,05$) en [tHcy], con respecto al día 0 entre los días 2º y 3º post infarto. La tHcy disminuye en los días siguientes, hasta llegar a un mínimo a los 60 días. En el grupo de mujeres se observa una tendencia ascendente no significativa, hasta el día 60. La figura 6.2-2 (a) y (b) recogen los resultados obtenidos.

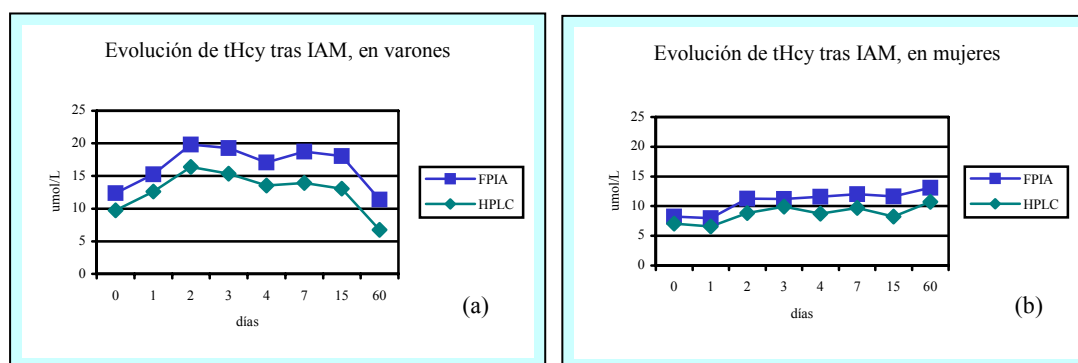


Figura 6.3-2 Evolución de [tHcy] hasta 60 días post IAM, en varones (a) y mujeres (b)

En general, se recomienda determinar los niveles plasmáticos de tHcy en el estudio del ictus isquémico en el paciente joven, en el paciente con ictus aterosclerótico, trombosis venosas cerebrales, aterotrombosis prematura o de repetición.

Sin embargo, la Asociación Americana del Corazón no recomienda generalizar la determinación de tHcy en la población general, si bien se ha sugerido que en determinados grupos de pacientes, podría determinarse la concentración de tHcy e indicarse un tratamiento con ácido fólico, vitamina B₆ y vitamina B₁₂ en caso de encontrarse elevada. Por el momento no existen ensayos clínicos aleatorizados finalizados que avalen la generalización de esta estrategia al conjunto de pacientes coronarios.

Desde el punto de vista de prevención en la población general y con carácter intervencionista, tiene mayor relevancia poder demostrar la presencia de incrementos moderados de tHcy plasmáticos, ya que éstos podrían ser, en general, fácilmente controlables con vitaminas.

➤ *Extracción de Leucocitos Polimorfonucleares Neutrófilos (PMNs)*

La separación y obtención de PMNs se lleva a cabo por centrifugación en gradiente. Las limitaciones del procedimiento se refieren fundamentalmente al tiempo transcurrido desde la extracción de sangre hasta su separación. Los PMNs se pueden activar con el tiempo, de forma que la separación podría quedar inactivada y su viabilidad comprometida. Otra limitación se refiere a las condiciones de esterilidad de trabajo, ya que la presencia de proteasas podrían producir degradaciones y la activación de PMNs, de forma que quedarían invalidados para la medición de proteínas de choque térmico HSP70i.

En estas condiciones, el rendimiento de extracción de PMNs es del orden del 90%, con una pureza de 95-97%. El número de PMNs obtenidos es variable y depende del volumen de

sangre obtenida y de la fórmula leucocitaria de cada individuo, por lo que la cuantificación de Hsps en PMNs se expresa en ng por mg de proteína, cuantificada por Lowry.

➤ ***Proteínas de choque térmico (Hsp70)***

Las limitaciones de los procedimientos utilizados se refieren a la variabilidad observada entre lotes diferentes del kit comercial, debido fundamentalmente al recubrimiento con anticuerpo de la microplaca.

6.4 ESTADO DE SALUD DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Dado el carácter aleatorio de la selección poblacional, y a pesar del tamaño muestral, los resultados obtenidos en relación al estado de salud cardiovascular, podrían ser aplicables a la población general. En base a las respuestas obtenidas en la entrevista realizada, encuesta epidemiológica, anamnesis y estudio bioquímico general, se observa que los individuos analizados, presentan niveles de colesterol total elevados (209 ± 38 mg/dL), superiores al nivel recomendado (200 mg/dL) como deseable³⁵⁰, de forma que el 62,6% presenta hipercolesterolemia, sin que existan diferencias con respecto al sexo. El 6,1% de los individuos encuestados recibe tratamiento con estatinas y el 13,0% presenta hipertensión arterial (HTA > 140 / 90 mm Hg).

Todos los individuos incluidos en el estudio, a excepción de los 10 pacientes con enfermedad cardiovascular, son sujetos *a priori* sanos, que sin embargo tras aplicar la carta de factores de riesgo vascular de la *Task Force*, el 25,21% se clasifican en el grupo G1 con factores de riesgo vascular moderado, de los que el 68,96% son varones (tabla 6.4-I), sin que tuvieran conocimiento previo de ello.

Grupo	Sexo	Frecuencia	%
G0=NO FRV	mujer	44	57,89
	varon	32	42,10
	Total	76	66,08
G1=FRV MODERADO	mujer	9	31,03
	varon	20	68,96
	Total	29	25,21
G2=ENFERMEDAD	mujer	5	50,00
	varon	5	50,00
	Total	10	8,69
TOTAL		115	100

Tabla 6.4-I Distribución de la población por grupo de riesgo vascular y sexo.

Como consecuencia del estudio, se instauró tratamiento preventivo en 15 individuos y se les ha ofrecido seguimiento clínico. Esto corrobora la idea del desconocimiento del estado de salud cardiovascular de la población, lo que contribuye al desarrollo silente de la enfermedad cardiovascular, en la que individuos asintomáticos podrían sufrir un evento cardiovascular. Por ello la búsqueda de factores de riesgo vascular que se puedan aplicar de forma sencilla a

la población, es un tema de interés sanitario y prioritario en países desarrollados, en los que la primera causa de muerte es la enfermedad cardiovascular.

Con respecto al hábito tabáquico, es evidente que en los últimos 5 años está disminuyendo, lo que se confirma mayoritariamente en nuestra población en la que el 71,3 % se define como no fumador. El 15,7% fuma entre 1-10 pitillos/día, mientras que el 13,0% refiere fumar entre 10-20 pitillo/día.

La ingesta de alcohol es moderada. El 53,0% manifiesta no ingerir alcohol. El 39,1% refiere una ingesta de alcohol menor de 40 gramos/día, el 7,0% ingiere entre 40-80 gramos de alcohol diarios, mientras que el 0,9% ingiere >80 gramos de alcohol diarios. Sin embargo los resultados obtenidos en relación con los hábitos tabaquito e ingesta de alcohol no son extrapolables a población general, ya que dado el ámbito de trabajo (un hospital) podría existir un sesgo.

6.5 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE PCR, HOMOCISTEÍNA, Hsps y ANTICUERPOS anti-Hsps. RELACIÓN EN POBLACIÓN CON O SIN FACTORES DE RIESGO VASCULAR

➤ PCR y RIESGO VASCULAR

El uso conjunto de valores de PCR y colesterol total, aumenta la predicción de riesgo de un futuro evento cardiovascular independiente de los niveles de colesterol-LDL, lo que sugiere que valores elevados de PCR podrían identificar individuos asintomáticos con valores de colesterol total elevados, con un alto riesgo de futuros eventos cardiovasculares³⁵¹.

Está descrito que en el síndrome metabólico, los niveles elevados de triglicéridos, colesterol-HDL reducido e hipertensión, correlaciona con valores elevados de PCR³⁵².

Esta asociación se confirma en nuestro estudio, en el que se demuestra la existencia de correlación entre PCR y triglicéridos ($p=0,001$) y PCR e hipertensión ($p=0,04$). Sin embargo, en nuestra población, la correlación inversa descrita arriba entre PCR y colesterol-HDL no alcanza significación estadística ($p=0,105$).

La PCR se considera un marcador independiente de riesgo vascular³⁵³, y se recomienda su uso en población general, para la predicción global de riesgo vascular en pacientes asintomáticos.

La distribución de los valores de PCR obtenidos en la población analizada, no se ajustan a una distribución normal, por lo que los valores de referencia se han calculado obteniendo el percentil 95 (P_{95}). Así el valor de discriminación ó de alarma quedó establecido en 5 $\mu\text{g/mL}$.

Como se recoge en la tabla 5.2-IV de esta memoria, los valores de PCR, de acuerdo con lo esperado, aumentan al segmentar la población por grupos de factor de riesgo vascular y este aumento alcanza diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos, de forma que el grupo G1 con factores de riesgo vascular moderado presentan valores de PCR superiores al valor de discriminación establecido. Estos datos coinciden con la teoría que considera la PCR como un marcador de riesgo vascular robusto.

➤ HOMOCISTEÍNA y RIESGO VASCULAR

El estudio de pacientes con homocistinuria, cuya concentración de tHcy es del orden de 10 veces la de la población general, y que desarrollan enfermedad cardiovascular en edades tempranas, lleva a McCully⁸⁵ a sugerir la hipótesis de que el incremento moderado de homocisteína total en plasma puede relacionarse con el riesgo de enfermedad en la población general. La suplementación de la dieta con vitamina B y betaina en pacientes con homocistinuria, reduce de forma muy efectiva los niveles de tHcy y disminuye el riesgo de enfermedad vascular⁸⁴.

Son numerosos los estudios epidemiológicos observacionales, en los que se han demostrado asociaciones entre la concentración de tHcy y el riesgo de enfermedad cardiovascular e ictus, tanto en población general como en población con enfermedad vascular preestablecida. Los estudios prospectivos realizados, aunque más débiles e inconsistentes que los estudios retrospectivos, son más fiables ya que no son vulnerables a desviaciones debido al efecto de la enfermedad en la [tHcy], efecto denominado “causalidad reversa”³⁵⁴. Un metaanálisis de estudios prospectivos demostró que, tras el ajuste con respecto a factores de riesgo vascular establecidos, concentraciones bajas de tHcy, se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y de ictus³⁵⁵.

No está claro si existe una relación causal entre homocisteína y riesgo vascular, o si la homocisteína está relacionada con otros factores de riesgo vascular, lo que podría constituir un elemento de confusión, o si es un marcador de enfermedad existente. Aunque el cribado poblacional de hiperhomocisteína no es recomendable, en individuos que han manifestado enfermedad aterotrombótica en ausencia factores de riesgo clásicos, es aconsejable realizar el cribado de tHcy¹⁹³.

En la población objeto de este estudio, los varones presentan niveles de tHcy superiores (9,21 $\mu\text{mol/L}$) al grupo de las mujeres (7,72 $\mu\text{mol/L}$), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,029$).

Estudios poblacionales^{158,159,160} demuestran que la prevalencia de hiperhomocisteinemia (HHcy) en población general es del 5-7%, sin embargo en el presente trabajo la población analizada arroja una prevalencia de HHcy de 11,3%, superior a la descrita. Aplicando el punto de corte establecido por sexo se observa que las mujeres presentan una frecuencia de HHcy (13,8%) superior a los hombres (8,8%).

Al segmentar por grupo de riesgo vascular, se demuestra que en los grupos con factores de riesgo vascular moderado (G1) y de enfermedad declarada (G2), la prevalencia de HHcy es significativamente mayor ($\chi^2 = 0,03$, Fisher=0,04) que en el grupo sin factores de riesgo (G0), tal como se recoge en las tablas 5.2-IX y 6.4-I, mientras que en el grupo G0, la prevalencia de HHcy (5,3%) es similar a la descrita en la población general. Hay que resaltar que 2 de las 9 mujeres del G1 (22,2%) presentan HHcy, mientras que solo 3 de 17 varones del G1 (15%), presentan HHcy.

Agrupado por riesgo vascular				tHcy				
HHcy $\geq 11-14 \mu\text{mol/L}$		Frecuencia	%		N	Sexo	Media	s
G0=NO FRV	No	72	94,7	G0	44	Mujer	7,39	1,96
	Si	4	5,3		32	Varón	8,09	1,97
	Total	76	100,0	G1	9	Mujer	8,22	2,54
G1=FRV MODERADO	No	24	82,8		20	Varón	10,45	6,82
	Si	5	17,2					
	Total	29	100,0	G2	5	Mujer	9,80	3,27
G2=ENFERMEDAD	No	6	60,0		5	Varón	11,40	4,50
	Si	4	40,0					
	Total	10	100,0					

Tabla 6.5-I Prevalencia de Hiperhomocisteinemia observada al agrupar por riesgo vascular.

Estos datos corroboran la hipótesis que considera la hiperhomocisteinemia como factor independiente de riesgo vascular¹⁵⁷.

Aunque es evidente que los grupos de mayor factor de riesgo presentan valores elevados de tHcy, y el tratamiento con ácido fólico reduce sus niveles, hoy por hoy no existe evidencia científica clara que avale que la reducción de los niveles de tHcy reduzca el riesgo de enfermedad vascular.

Los trabajos realizados hasta el momento, sugieren que el aumento moderado de tHcy, en población no fortificada con fólico, es un modesto factor de riesgo cardiovascular, más fuerte para riesgo de ictus³⁵⁴.

➤ PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, ANTICUERPOS anti-Hsps Y RIESGO VASCULAR

Las Hsps comprenden al menos 24 familias con un alto grado de homología en su secuencia entre diferentes especies. Una de las más estudiadas en relación con la aterosclerosis y enfermedad cardiovascular ha sido la familia de las Hsp70.

El papel de las Hsps en la enfermedad cardiovascular es complejo. Parece que las Hsp70 juegan un papel citoprotector, de forma que niveles elevados de Hsp70 se asociarían con un bajo riesgo cardiovascular y baja severidad de la enfermedad³⁴³. Niveles bajos de Hsp70 se asocian con presencia de aterosclerosis y la disminución de las Hsp70 podría incrementar la vulnerabilidad del tejido cardiovascular al entorno y a los agentes estresantes.

Por otra parte, los niveles de Hsp70 se han relacionado con la presencia en la placa de ateroma de actividad proteolítica elevada. Sobre la base de que los polimorfonucleares son la clase de leucocitos predominante, concentrados por la hemorragia intraplaquetaria, se han estudiado marcadores de actividad de polimorfonucleares neutrófilos como mieloperoxidasa (MPO) y metaloproteínasa (MMP-9). Así los neutrófilos activados podrían ser una fuente de proteasas capaces de degradar las Hsp70 intracelulares, sintetizadas en respuesta a la agresión (protectoras de aterosclerosis), lo que provocaría un descenso de los niveles de Hsp70 en situación de enfermedad declarada. La incubación *in vitro* de Hsp70 con elastasa produce proteólisis, similar a lo que ocurre al incubar con placas de aterosclerosis *ex vivo* y cuyo efecto es neutralizado por inhibidores de elastasa³⁵⁶. Así mismo se ha demostrado, en humanos, actividad elastasa en neutrófilos.

Los datos de Martín-Ventura³⁵⁶ soportan la idea de que las proteasas sintetizadas en la activación de PMNs, involucradas en la aterosclerosis, se encargarían de la degradación proteolítica de las Hsp70 sintetizadas como factor protector.

Los datos presentados en esta memoria con respecto a los niveles de Hsp70 en PMNs, (tabla 5.2-XIII), apoyarían esta teoría, habiéndose observado un aumento de la síntesis de Hsp70 en respuesta a la agresión, de forma que el grupo de individuos con factor de riesgo moderado (G1) presenta los niveles de Hsp70 más altos, siendo superior al grupo G0 sin factores de riesgo. El hecho de que en el grupo de individuos con enfermedad declarada (G2), se produzca una disminución de Hsp70, podría indicar que en situación de enfermedad, el sistema de producción de Hsp70 intracelular se agotaría. El aumento de Hsp70 intracelular en el G1, no se asocia con otros factores de riesgo vascular clásicos como sexo, hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes.

Aunque en relación con el hábito tabaquico, se ha descrito que el tabaco induce la síntesis de Hsp70 en PMNs³⁵⁷, en nuestra población se observa un ligero incremento entre G0 y G2 cuando el consumo de tabaco es muy elevado, pero que no alcanza significación estadística.

En base a los resultados obtenidos, se plantea la siguiente hipótesis:

El aumento de la expresión de Hsp70 intracelulares, provocaría su movilización hacia a la membrana celular, produciéndose la salida de la célula de las Hsp70, de tal manera que la concentración de Hsp70 circulantes podría reflejar el balance entre su secreción por arterias sanas y su degradación por las proteasas ateroscleróticas, constituyendo un probable indicador de la situación intracelular, de forma que aquellos individuos que presentaran enfermedad aterosclerótica, tendrían los valores más bajos de Hsp70 sérica.

Los datos recogidos en la tabla 5.2-XVII, para Hsp70 séricas reflejan una situación similar a la anterior (Hsp70 en PMNs), de manera que los niveles más bajos de Hsp70 séricas se presentan en el grupo de riesgo vascular (G2).

Como cuestiona Hooper³⁵⁸, ¿son los niveles bajos de Hsp70 séricas los que constituyen el primer evento en la aterosclerosis?, o ¿son los niveles de Hsp70 los que disminuyen como resultado de la aterosclerosis?.

La mayoría de los trabajos se han centrado en las Hsp70 como moléculas intracelulares, sin embargo su papel citoprotector como molécula extracelular está menos estudiado. Si el origen de las Hsp70 circulantes fuera el endotelio, podría ser razonable asumir que los niveles están influenciados por la activación endotelial de forma directa ó bien por la generación comprometida de NO. Sin embargo las Hsp70 inducen la producción de NO a partir de macrófagos.

Las Hsps circulantes parecen influir en la progresión de aterosclerosis. Así en pacientes con hipertensión establecida, el grosor de la capa íntima-media, como medida de la enfermedad cardiovascular (ECV), disminuye en aquellos pacientes con niveles de Hsps circulantes elevadas, mientras que niveles bajos de Hsp70 séricas, en el mismo grupo de pacientes, se asocian con aterosclerosis en sujetos con hipertensión establecida³¹⁰, enfermedad coronaria³⁴³ y aterosclerosis³⁵⁹. Esto indicaría que las Hsp70 circulantes pudieran predecir el desarrollo de aterosclerosis y se sugiere que las Hsp70 podrían proteger frente a la aterosclerosis, o modificar su progresión en este tipo de sujetos.

Estudios previos demuestran la existencia de una correlación inversa entre los niveles de Hsp70 circulantes y la progresión de la aterosclerosis. Sin embargo no se han explorado los posibles mecanismos que pudieran explicar esta relación inversa^{310,360}.

En nuestro trabajo se observa que aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, al segmentar por grupo de riesgo vascular la población estudiada, el grupo G2 de enfermedad presenta los valores más bajos de Hsp70 séricas y al analizar con respecto a la presencia de HTA, el grupo de sujetos con hipertensión establecida presenta una distribución de [Hsp70] séricas con un intervalo menor (0,31-3,19 ng/mL) que el grupo sin HTA (0,19-7,59 ng/mL), como se recoge en las figuras siguientes

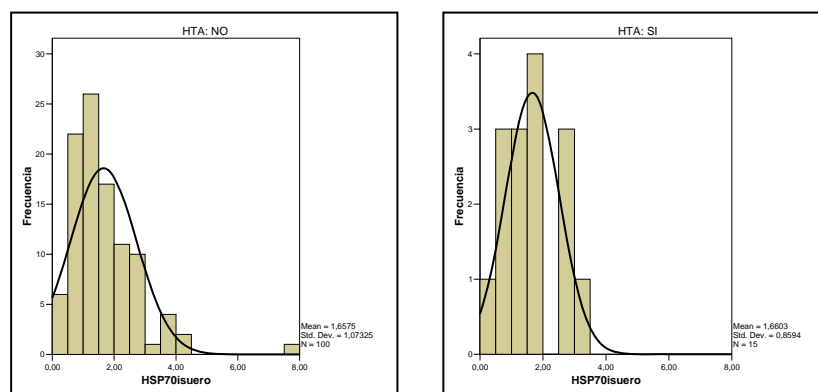


Figura 6.5-1 Distribución de los valores de Hsp70 séricas, en ausencia/presencia de Hipertensión Arterial (HTA: NO/SI)

Recientemente Svenson³⁶¹, demuestra que las Hsp70 sintetizadas por macrófagos en respuesta al tratamiento con LDL-oxidadas, pueden actuar como potente inductor paracrino en la expresión y producción de citoquinas, sugiriendo que las Hsp70 extracelulares, además del papel citoprotector otorgado a las HSPs intracelulares²⁷⁴, podrían estar relacionadas con la acumulación lipídica inducida por LDL oxidadas en macrófagos y por tanto con la iniciación del proceso inflamatorio en la placa aterosclerótica.

En nuestro trabajo, aunque en la población global no se demuestra correlación entre los niveles de LDL-colesterol y Hsp70 sérica ($p=0,714$), al fragmentar por grupo de riesgo vascular, se observa que la [LDL-colesterol] y [Hsp70] séricas, aumentan en el grupo G1 de riesgo vascular moderado, con respecto a los otros grupos de riesgo vascular, aunque la correlación no alcanza significación estadística ($p=0,200$), lo que podría apoyar la teoría de Svenson.

Aunque algunos trabajos muestran que las Hsp70 séricas e intraleucocitarias disminuyen con la edad³⁶², y que podrían relacionarse con el estrés por envejecimiento, en nuestra serie no se ven afectados los niveles ni por edad, debido probablemente al intervalo (40-60 años) de nuestra población, ni por sexo.

Se ha demostrado una clara relación entre Hsp60 y enfermedad cardiovascular (ECV)²⁷⁶, aunque la relación entre Hsp70 ó anticuerpos anti-Hsp70 y ECV ó fenotipos con riesgo de ECV no está clara.

Las Hsp70 se han detectado en placas tanto fibróticas como necróticas³⁴⁴ y se sabe que los macrófagos son una fuente importante de producción de Hsp70 en la placa aterosclerótica³⁶³.

Al aumentar los niveles de Hsp70 séricas, éstas ejercerían como auto-antígenos provocando la respuesta inmune y la síntesis de anticuerpos anti-Hsp70. La detección de los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 (tabla 5.2-XXI), muestra que al aumentar las Hsp70 séricas, aumentaría la formación de complejos antígeno-anticuerpo, disminuyendo los niveles de anticuerpos circulantes, situación que reflejaría lo que sucede en el G1. Lo contrario ocurre en el G0 y G2 en donde, aunque por razones opuestas, la formación de complejos será menor, dado que los niveles de Hsp70 séricas son menores, aumentando en consecuencia los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes.

Los anticuerpos circulantes anti-Hsp60 disminuyen con la enfermedad, de forma que las Hsp60 séricas aumentarían, como consecuencia de su sobreexpresión intracelular, transporte y vertido al torrente circulatorio.

Las estatinas reducen significativamente los niveles de anticuerpos anti-HSP60 y anti-Hsp70³⁶⁴. Esta reducción no se explica por el efecto antiinflamatorio de las estatinas³⁶⁵, y no se asocia con cambios en los niveles de proteína C reactiva (RCP).

En nuestra población, en el momento del reclutamiento, solo 7 de los 115 individuos individuos, refieren estar en tratamiento con estatinas, los cuales presentan niveles de anticuerpo anti-Hsp60 circulantes inferiores a los individuos sin tratamiento, como se recoge en la tabla 6.5-II, que aunque debido al pequeño tamaño muestral no alcanza significación estadística, al aumentar el número de individuos se confirma una reducción significativa³⁶⁶.

Anticuerpos anti-Hsp60					
Estatinas	N	Mín	Máx	Media	s
NO (tto)	108	10,01	346,50	63,26	60,72
SI (tto)	7	19,91	50,81	33,29	10,75

Tabla 6.5-II Niveles de anticuerpos circulantes anti-Hsp60, por grupo de tratamiento con estatinas.

➤ RELACIÓN ENTRE Hsps, tHcy y PCR

Siguiendo la hipótesis planteada anteriormente, podría ocurrir que en aquellos individuos con tHcy elevada (factor de riesgo), se indujera una respuesta de choque térmico o respuesta de estrés, con el consiguiente aumento de Hsp70 intracelular, aumento de Hsp70 séricas y respuesta inmune. En consecuencia los anticuerpos anti-Hsp70 circulantes deberían disminuir al aumentar la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Si por el contrario sucede un aumento de actividad proteasa, las Hsp70 intracelulares podrían ser degradadas, disminuyendo la [Hsp70] séricas y aumentando los niveles de anticuerpos circulantes. Así en los individuos del G1 con riesgo vascular moderado, se demuestra la existencia de una correlación directa entre tHcy y anticuerpos anti-Hsp70 circulante, lo que se podría explicar bien por una respuesta de choque térmico tardía (no aumento de expresión de Hsp70), ó bien por un aumento de la destrucción de Hsp70 intracelular.

No se ha demostrado relación entre los niveles de Hsps, ni anticuerpos con la proteína C reactiva. Sin embargo sí se produce asociación entre los niveles de tHcy y PCR. Así, se confirma la existencia de correlación directa entre los niveles de [tHcy] y [PCR] en población general ($p=0,002$), que se produce a expensas de las mujeres del G0 ($p=0,007$)

Dado que, aunque no existe diferencias estadísticamente significativas, las mujeres presentan niveles superiores de Hsp70 intracelulares que los varones, se podría explicar este aumento de Hsp70 en respuesta a la agresión producida en aquellas mujeres con niveles elevados de tHcy y PCR, lo que habrá que demostrar con un tamaño muestral mayor. Las mujeres del grupo G1, presentan valores medios de tHcy menores y niveles de Hsp70 intracelulares superiores a los valores medios que presentan los varones del G1, lo que se podría explicar si hubiera una asociación entre sexo y fenotipo “hiper” productor de Hsp70.

6.6 POLIMORFISMO 677C>T. INFLUENCIA EN tHcy y Hsps

La enzima 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la conversión del 5,10 metilen-tetrahidrofolato en 5-metil-tetrahidrofolato, que es la principal forma circulante del folato. El polimorfismo 677C>T de la MTHFR se asocia con niveles elevados en plasma de homocisteína y está implicado como factor de riesgo en la enfermedad trombótica. Este polimorfismo provoca la sustitución en posición 222 de alanina por valina, lo que da lugar a una enzima termolábil cuya actividad específica está sensiblemente disminuida¹³², hasta un 50% en los individuos homocigotos mutados (HM) con genotipo TT, por lo que dichos individuos presentan una tendencia a lo largo de su vida a padecer hiperhomocisteinemia moderada³⁶⁷.

La variante termolábil de la MTHFR está presente en el 5% de la población general³⁶⁸ y en el 17% de los pacientes con enfermedad coronaria. El genotipo TT se ha asociado con un aumento de los niveles de tHcy^{89,369,370,371}.

La relación entre la presencia del polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR y el riesgo de enfermedad cardiovascular no ha sido claramente demostrada, siendo numerosas las publicaciones existentes en ambos sentidos.

Algunos autores describen una asociación entre el genotipo TT y un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular prematura³⁷², aunque la ausencia de una clara evidencia^{89,373}, lo convierte en un tema controvertido. En pacientes con alto riesgo de enfermedad cardiovascular se ha asociado el genotipo TT con la extensión de aterosclerosis coronaria³⁷⁴.

La frecuencia del genotipo TT varía a nivel internacional, asociándose a una distribución geográfica, siendo más alta en población de origen hispano, más baja en poblaciones con ancestro europeo y menor en poblaciones con ancestro de origen africano^{375,376}. Así en países como Francia, Hungría y España, el genotipo TT, aparece con una frecuencia del 10-12%, mientras que en países nórdicos como Finlandia y Holanda, la prevalencia es menor (4-6%), lo que contrasta con una elevada prevalencia en el sur de Europa, que alcanza entre el 20-26% en Sicilia. También se ha descrito una frecuencia del 20% en ciertos grupos hispanos de Estados Unidos y América Latina, a diferencia de la observada en grupos de África(1%)^{377,354,367}. Un metaanálisis realizado por Wald⁸⁹ sobre 72 estudios en relación con el polimorfismo 677C>T de la MTHFR y 20 estudios prospectivos realizados sobre homocisteína y riesgo vascular, concluye que la asociación entre homocisteína y enfermedad cardiovascular es causal.

➤ INFLUENCIA DEL 677C>T EN [tHcy]

Estudios prospectivos realizados para el estudio de asociación entre riesgo de enfermedad cardiovascular y el polimorfismo 677C>T de la MTHFR, demuestran que la presencia del genotipo TT, confiere un aumento de los niveles de tHcy del orden de 25% superior a individuos con genotipo CC. Recientemente, un trabajo realizado sobre población gemelar³⁷⁸, para estudio de herencia de niveles de tHcy, confirma la importancia del polimorfismo 677C>T como el mayor determinante de la concentración de tHcy en población no suplementada con ácido fólico.

La frecuencia del polimorfismo 677C>T, descrita en población española control³⁷⁹, es del 16%.

En un estudio realizado en España³⁸⁰, sobre 46 pacientes con enfermedad vascular, el 34,8% presentaba en homocigosis el alelo T, de los que el 62% presentaba valores de homocisteína superior a 12 $\mu\text{mol/L}$. La frecuencia observada es muy superior a la encontrada en estudios previos^{377,381}.

Los datos obtenidos en este trabajo, muestran que el 44,3% de la población presenta en heterocigosis la mutación (CT), similar a lo descrito en la literatura^{130,382}, mientras que el 19,1% presenta en homocigosis el alelo T, porcentaje similar a lo encontrado en los estudios realizados en población latinoamericana, con una frecuencia alélica en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, que no se modifica al fragmentar por sexo. Sin embargo al fragmentar por grupo de riesgo vascular se observa que la frecuencia del genotipo TT es superior en los grupos con factores de riesgo vascular frente al grupo sin factores de riesgo (G0). Esta diferencia alcanza significación estadística, lo que apoyaría la teoría de asociación entre genotipo TT y riesgo vascular.

A pesar de ser un tema controvertido, en el presente trabajo se observa que los sujetos que presentan la mutación en homocigosis, arrojan los niveles más altos de tHcy, especialmente los varones pertenecientes al G1, si bien en el grupo con enfermedad (G2) el pequeño tamaño muestral no permite inferir conclusiones estadísticamente significativas, lo que confirmaría que la presencia de la mutación en homocigosis se asocia a elevación de tHcy y que ésta es un factor aterogénico independiente.

Está descrito que los niveles de homocisteína aumentan con la edad. Al analizar los datos en la población estudiada y dado el intervalo de edad (40-60 años), no se observa un aumento

significativo de los valores de homocisteína. Sin embargo, al segmentar la población de acuerdo a la presencia/ausencia del polimorfismo 677C>T, se observa que solo en el grupo que presenta la mutación en heterocigosis, se produce un aumento de la tHcy con la edad (Fig 6.6-1 y tabla 6.6.I), que es estadísticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p=0,025$). Esta observación hasta ahora no documentada, podría ser debido al tamaño muestral, lo que habrá que confirmar en estudios posteriores con una muestra poblacional mayor.

		tHcy				
677C>T	Edad	N	Mín	Máx	Media	s
WT	40-44	7	5	9	7,14	1,676
	45-49	15	5	13	8,33	2,059
	50-54	6	5	10	8,33	1,966
	55-59	9	5	10	8,33	1,936
	=60	5	5	13	8,60	3,286
HT	40-44	13	4	11	6,85	2,154
	45-49	18	4	12	7,33	2,351
	50-54	17	6	12	8,35	1,766
	55-59	3	9	18	12,67	4,726
HM	<40	3	6	36	20,33	15,044
	40-44	3	8	10	8,67	1,155
	45-49	6	5	12	8,83	2,563
	50-54	6	6	14	8,83	3,061
	55-59	3	6	14	9,00	4,359
	=60	1	9	9	9,00	.

Tabla 6.6-I Niveles de tHcy, agrupado por 677C>T y edad

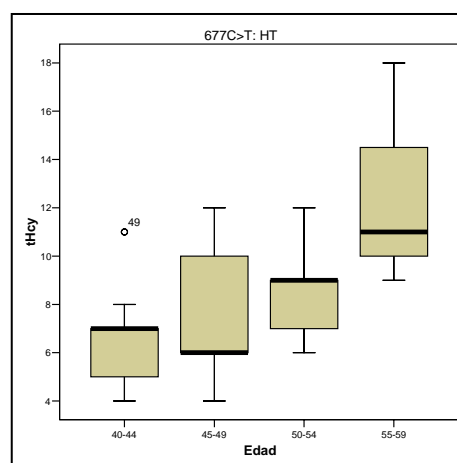


Figura 6.6-1 tHcy por edad con 677C>T: HT

➤ INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO 677C>T EN [Hsp70] Y ANTICUERPOS anti-Hsps

La búsqueda de nuevos factores de riesgo vascular nos lleva al análisis de la posible relación de este polimorfismo sobre las Hsps.

La influencia de esta mutación (presencia/ausencia) sobre los niveles de Hsps no está documentada, y se desconoce su relevancia, ya que el genotipo para la mutación 677C>T y la biología de las Hsps son factores independientes en la etiopatogenia de la aterosclerosis.

Sin embargo y en contra de lo que se podría esperar, los resultados obtenidos (tabla 5.5-I) muestran la existencia de una posible asociación entre genotipo y expresión de Hsp70 intracelular en población general, de manera que aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, los sujetos que presentan la mutación en homocigosis (TT), presentan los niveles más elevados de Hsp70 intraleucocitaria (PMNs), con niveles más bajos de anticuerpos anti-Hsp60, especialmente en individuos HM para la 677C>T pertenecientes al G1, lo que coincide con los niveles más altos de tHcy.

En relación al sexo, las mujeres que de forma global presentan niveles superiores de Hsp70 intracelulares más altas que los varones, lo hacen a espensas del grupo WT (CC), cuya diferencia con los varones es casi significativa. El genotipo salvaje CC parece se asocia con niveles más bajos de Hsp70 intracelulares.

Además se ha observado que el % de individuos catalogados como “hiper” productores de Hsp70 en PMNs, es superior en el grupo HM (TT), como se recoge en la figura 6.6-2

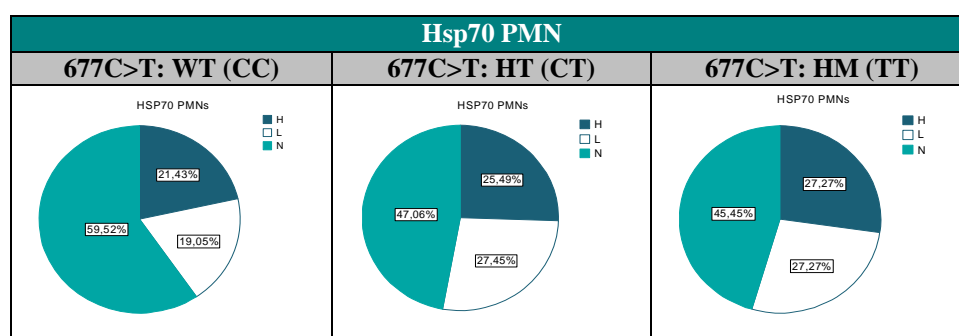


Figura 6.6-2 Producción (en %) de Hsp70 en PMN (A) de acuerdo con 677C>T.
Donde H: “hiper” productor, N: “normo”productor y L: “hipo” productor.

Considerando la hipótesis de que una HHcy de origen genético (genotipo TT), constituye un factor de riesgo vascular independiente, el grupo de individuos clasificados como “hiper” productores de Hsp70, tendrían un mejor pronóstico y estarían más protegidos frente a un posible evento vascular que aquellos individuos con genotipo TT que sean “hipo” productores de Hsp70.

Por el contrario los individuos heterocigotos con genotipo CT pertenecientes al grupo G2, presentan los menores niveles de Hsp70 en PMNs, lo que se explica bien por un menor nivel de tHcy y en consecuencia menor riesgo, bien por agotamiento del sistema de las Hsps en la enfermedad, o bien debido al pequeño tamaño muestral de los grupos obtenido cuando se realiza una segmentación de los casos.

Con respecto a las Hsp70 séricas, se observa que el mayor % de “hiper” productores se encuentra en el grupo con genotipo TT (figura 6.6-3), de forma similar a lo que ocurre con las Hsp70 en PMNs, lo que parece constituir un reflejo de la situación intracelular. De igual manera los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes son menores en el grupo con genotipo TT.

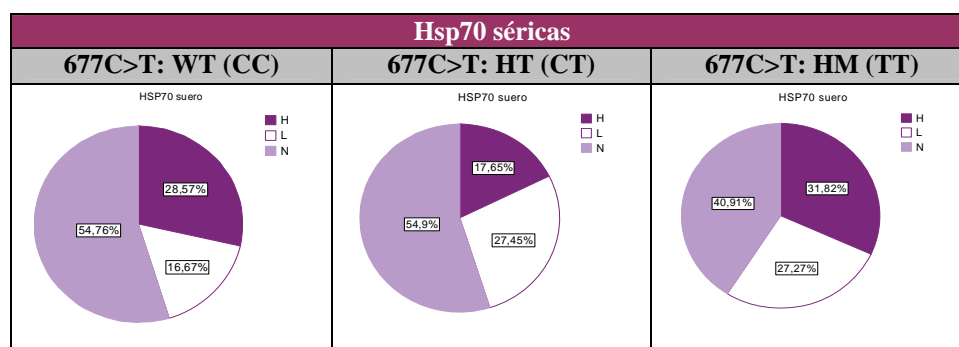


Figura 6.6-3 Producción (en %) de Hsp70 séricas de acuerdo con 677C>T
Donde H: “hiper” productor, N: “normo”productor y L: “hipo” productor

Podría resultar de interés analizar de forma individual la relación entre tHcy, Hsp70 en PMNs y presencia 677C>T, especialmente en varones (\uparrow tHcy, \downarrow Hsp70 PMN), ya que su combinación serviría como un índice predictivo de riesgo vascular. No obstante esta asociación debe tomarse con cautela ya que *a priori* son factores de riesgo vascular no relacionados entre sí y dado que la asociación no alcanza significación estadística, podría ser de origen casual y no causal. Sin embargo y a la búsqueda de factores de riesgo y posibles asociaciones, ésta podría resultar muy interesante.

6.7 POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN *hsp70*. INFLUENCIA EN LOS NIVELES DE *Hsps* Y ANTICUERPOS *anti-Hsps*

Las proteínas de choque térmico (Hsps), proteínas altamente conservadas, son inducidas, tanto en procariotes como en eucariotes, por una gran variedad de agentes capaces de provocar un estrés celular. La denominada respuesta celular al choque térmico (HSR) reduce la síntesis de numerosas proteínas y por un periodo determinado de tiempo incrementa la síntesis de Hsps, actuando éstas como caperonas uniéndose a proteínas sintetizadas con error de plegamiento o desnaturalizadas, lo que puede tener consecuencias letales, promoviendo su correcto plegamiento o su degradación³⁸³. El mecanismo molecular a través del cual las Hsps ejercen su protección frente al estrés no está bien definido. Está descrito que miembros de la familia de las Hsp70 se asocian con la defensa celular frente a procesos que provoquen estrés oxidativo como isquemia, inflamación y/o envejecimiento. Mientras que las Hsps intracelulares actúan como caperonas moleculares, ayudando en el plegamiento y mecanismo de transporte de otras proteínas en condiciones fisiológicas y de estrés³⁸⁴, las Hsps extracelulares juegan un importante papel en la inducción de la respuesta inmune celular. La unión de las Hsp libres a su receptor en células presentadoras de antígenos, se ha demostrado que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias³⁸⁵ en monocitos y actúan como una estructura de reconocimiento para células *natural killer* (NK)³⁸⁶.

La capacidad de la respuesta al choque térmico (HSR) desciende con la edad, disminuyendo la síntesis de Hsps y dejando más vulnerable al organismo frente a al daño celular³⁸⁷. El estudio molecular y la secuenciación de los genes *hsp* ha permitido la identificación y conocimiento de algunos polimorfismos (SNPs) que podrían estar implicados en la respuesta al estrés. Así, la búsqueda de polimorfismos en el gen *hsp70* que pudiera explicar la alteración cualitativa y cuantitativa de Hsp70 en el proceso de envejecimiento llevó al estudio del SNP 2437 T>C presente en la región codificante del gen *hsp70-Hom* para HSP1AL. Este polimorfismo da lugar al cambio de metionina por treonina en el dominio de unión al sustrato (18KDa), lo que podría modificar su especificidad³⁸⁸, alterando la efectividad funcional de la Hsp70. En estudios poblacionales realizados^{329,389}, se observa que la frecuencia del alelo C en homocigosis, con genotipo CC disminuye con la edad, lo que indicaría que individuos con este genotipo no alcanzan edad prolongada.

Trabajos recientes demuestran que el gen *hsp70-2* posee un único sitio de inicio de transcripción y que la efectividad de la transcripción requiere un fragmento mínimo de 392 pb

desde el codon de inicio ATG, mientras que la delección de 150pb desde 5' en la región del promotor, reduce drásticamente su actividad³⁹⁰.

Las Hsps, cuya actividad antiinflamatoria y en consecuencia protectora del desarrollo y progresión de la aterosclerosis, pueden utilizarse como biomarcador para evaluar el estado de enfermedad y la exposición a estrés, y el estudio de mutaciones relacionadas con su expresión, actividad y funcionalidad permitiría a priori, de una manera combinada la valoración del riesgo vascular .

No existen muchos estudios epidemiológicos acerca de la frecuencia en población general para las mutaciones estudiadas en este trabajo. Como se recoge en las tablas 5.7-II-IV los polimorfismos -326 A>C y -27 G>C, que se coexpresan, presentan una frecuencia de aparición muy superior al resto de polimorfismos estudiados, para los que no se ha realizado ningún análisis de su posible influencia en la expresión de Hsps.

La frecuencia de aparición de los distintos genotipos encontrada para los SNPs -326 A>C y -27G>C, es muy similar a la obtenida para la mutación 677C>T, tanto en población general (tablas 5.7-II y 5.4-II) como al segmentar por sexo (tabla 5.7-VII y 5.4-V), lo que podría sugerir, aunque con baja probabilidad, la existencia de una posible asociación o relación. Como era previsible, al realizar la correlación bivariada no paramétrica entre frecuencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70* y el gen de la MTHFR, se demuestra la ausencia de correlación, siendo simplemente una casualidad la similitud de porcentajes.

Por el contrario, al segmentar la población por grupo de riesgo vascular, se observa que la frecuencia de aparición del genotipo homocigoto mutado (HM) para el SNP del promotor del gen *hsp70-1*, es muy similar en los 3 grupos (G0, G1 y G2), lo que sin embargo no ocurre para el SNP de la MTHFR, en el que el genotipo HM es mucho menos frecuente en el grupo sin factores de riesgo vascular.

➤ INFLUENCIA DEL -326 A>C y -27G>C EN [Hsp70] Y ANTICUERPOS ANTI-Hsps

Los niveles elevados de Hsps70, cuya actividad antiinflamatoria está descrita, ejercen un papel protector en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

La presencia de alguna mutación que produjera disminución en la expresión de Hsp70, podría considerarse como un factor añadido de riesgo, alterando su papel protector frente a la enfermedad.

En la población estudiada, los individuos homocigotos mutados (HM) para los polimorfismos -326 A>C y -27 G>C, presentan los valores más bajos de Hsp70 en PMNs (tabla 5.8.1-I), siendo los varones HM del grupo G1 los que presentan niveles más bajos. Estos sujetos tendrían un potencial riesgo vascular más elevado que los aquellos WT o HT para los SNPs.

Las mujeres HT del G1 presentan los valores más altos de Hsp70 en PMNs, por lo que se podría pensar que el estado de portador constituye una situación protectora.

Completando el análisis, los individuos HM presentan los niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, lo que estaría en concordancia con la hipótesis del mecanismo seguida en esta memoria.

Al analizar la relación entre la presencia/ausencia de los SNPs con el % de expresión de Hsp70 en PMNs, se observa que % de “hiper” productores de Hsp70 en PMNs es menor cuando la mutación -326 A>C está en homocigosis, como se recoge en la figura 6.7-1.

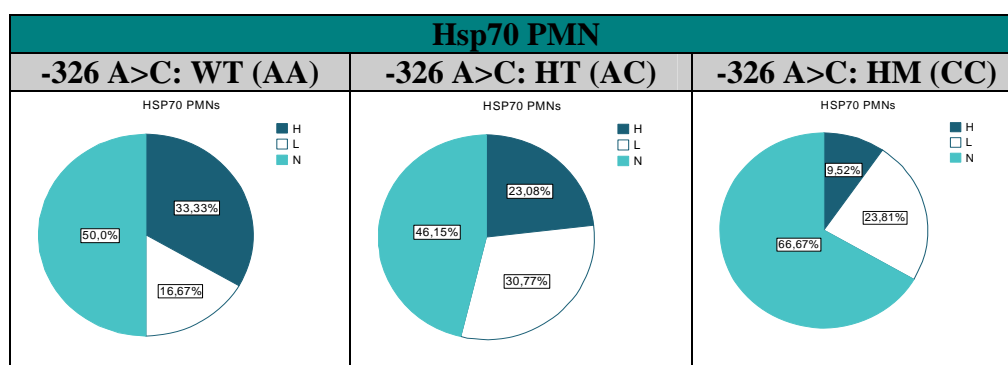


Figura 6.7-1 Producción (en %) de Hsp70 en PMN de acuerdo con -326 A>C.
Donde H: “hiper” productor, N: “normo”productor y L: “hipo” productor

Por tanto la presencia de las mutaciones -326 A>C y -27G>C en homocigosis, constituiría un factor de riesgo añadido.

Otro polimorfismo estudiado (-97T>C), aunque aparece con una frecuencia baja en heterocigosis (12%) en nuestra población, parece que podría ser protector de aterosclerosis,

especialmente en mujeres, aunque debe tomarse con cautela esta observación debido al bajo número de casos obtenidos en este grupo.

Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-Hsp60, no se ha podido demostrar ninguna relación entre los niveles de anticuerpos circulantes y la presencia/ausencia de los SNPs del promotor del gen *hsp70*. Sin embargo los niveles de anti-Hsp60 parecen estar relacionado con la enfermedad, ya que los menores valores se observan en el grupo G2 de enfermedad aterosclerosis.

Parece pues que los anticuerpos anti-Hsp60 no se modifican por mutaciones en genes diferentes del que codifica para su proteína y que sus valores están en relación sólo con la presencia de la enfermedad

Sin embargo, existe una correlación inversa y estadísticamente significativa ($p=0,019$) entre los niveles circulantes de anticuerpos anti-Hsp60 y tHcy, en el grupo de varones HT para la –326 A>C del G1 (tabla 5.9-IV). Si consideramos la HT como situación protectora, los varones del G1 en situación de \uparrow tHcy, \downarrow anti-Hsp60, \uparrow anti-Hsp70, que presenten valores más altos de Hsp70 en PMNs, tendrían mejor pronóstico.

Es una situación causal de HHcy? Cual es la causa?. O es una situación casual?

Por tanto, desde el punto de vista de evaluación de riesgo vascular, la peor situación sería: varón del G1 ó G2, HM para –326 A>C, “hipo” productor de Hsp70 PMNs, HHcy, con niveles de anticuerpos anti-Hsp70 elevados y niveles de anticuerpos anti-Hsp60 bajos.

6.8 BIOLOGÍA DE LAS Hsps EN LA ATEROSCLEROSIS

A lo largo de esta memoria se ha analizado el posible papel que las Hsps juegan en la aterosclerosis, estudiando individuos sanos a los que se ha aplicado la carta de riesgo coronario de la *Task Force*, quedando agrupados de acuerdo a su riesgo vascular, con el objetivo de comprender la biología de las Hsp70, sus relaciones y su actividad como autoantígenos, analizando como se comportan en la enfermedad (grupos G1 y G2).

En ausencia de factores de riesgo vascular, los individuos clasificados dentro del grupo G0, presentan una menor expresión de Hsp70 intracelular que el resto de individuos con algún factor de riesgo vascular. Este grupo presenta el mayor porcentaje (26,32%) de individuos “hipo” productores de Hsp70 PMNs, como recoge la figura 6.8-1, debido probablemente a la ausencia de agentes estresante.

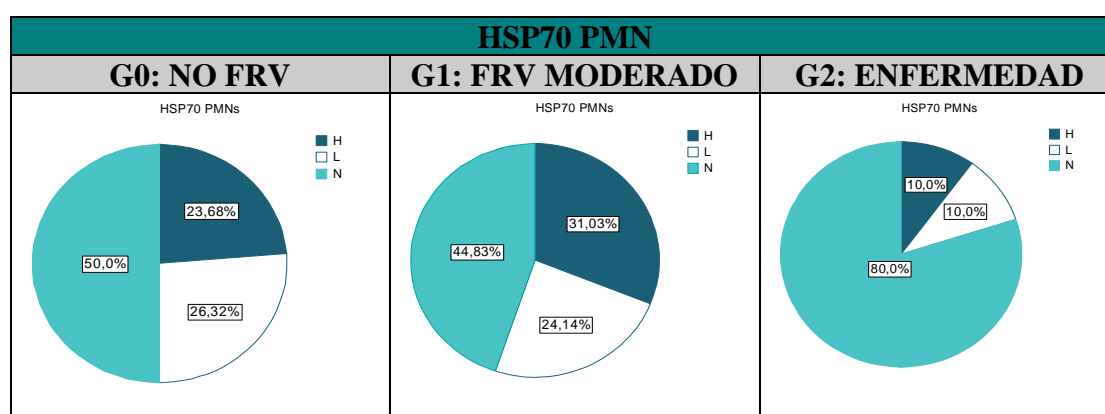


Figura 6.8-1 Producción (en %) de Hsp70 en PMNs de acuerdo al grupo de riesgo vascular. Donde H: “hiper” productor, N: “normo”productor y L: “hipo” productor

En este grupo (G0) se ha podido demostrar correlación directa ($p=0,029$) entre los niveles circulantes de anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60, lo que parece indicar, incluso en ausencia de estrés, la existencia de un mecanismo autoinmune. Los niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp60 se presentan en el G0. Esta correlación es más significativa ($p=0,005$) en los individuos G0 que presentan la mutación $-326 A>C$ del promotor del gen *hsp70* en heterocigosis.

A la vista de los resultados obtenidos y a la búsqueda de nuevos marcadores que de forma individual pudieran indicar un futuro riesgo vascular, se podría plantear que en este grupo (G0) el aumento de Hsp70 intracelular estaría justificado en respuesta a algún tipo de estrés a priori no detectado, de forma que individuos clasificados hiper productores de Hsp70 intracelular, estarían en mayor riesgo que los “normo”(N) o “hipo”(L) productores. Por tanto

un aumento en la expresión de Hsp70 intracelular en individuos del G0, constituiría un indicador de alarma de futuro riesgo.

En presencia de factores de riesgo vascular moderado, se induce la expresión de Hsp70 intracelular en respuesta a la agresión, de forma que los individuos del grupo G1 presentan los niveles más altos de Hsp70 en PMNs, así como el porcentaje más alto (31,03%) de sujetos “hiper”(H) productores, tal y como se muestra en la figura 6.8-1. Las mujeres del G1, presentan niveles más altos que los varones. Así mismo se ha observado la existencia de una correlación inversa entre Hsp70 en PMNs y anticuerpos circulantes anti-Hsp60, que alcanza significación estadística ($p=0,007$) en las mujeres del G1, en las que se demuestra también correlación inversa y significativa ($p=0,005$) entre los niveles de Hsp70 séricos y anticuerpos circulantes anti-Hsp70, lo que apoya el mecanismo de acción propuesto anteriormente.

En este grupo (G1) las mujeres tendrán un mejor pronóstico, mientras que los individuos “hipo” productores de Hsp70 en PMNs, especialmente varones, tendrían un peor pronóstico.

En el grupo de enfermedad (G2), se produce igualmente una correlación entre Hsp70 PMNs y suero, que en el caso de las mujeres es significativa ($p=0,037$), lo que confirmaría el mecanismo propuesto, pero sin embargo en las mujeres se observa una correlación directa entre niveles de Hsp70 en PMNs y anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, situación inversa a la que se produce en los grupos G0 y G1 y en los varones del G2, lo que podría indicar que en el grupo de mujeres en situación de enfermedad (G2), la formación del complejo antígeno-anticuerpo se modifica, bien por alteración de los sitios de unión del anticuerpo anti-Hsp70, o bien por una alteración de las propiedades de Hsp70 séricos como antígeno. Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral del G2, es difícil sacar conclusiones.

Una situación similar ocurre con los anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, en donde las relaciones observadas se producen de forma inversa cuando se compara de acuerdo al sexo, de forma que los hombres del G2 presentan correlación directa ($p=0,037$) entre Hsp70 séricos y anticuerpos anti-Hsp60 circulantes, mientras que las mujeres del G2 presentan correlación inversa que no alcanza significación.

La presencia de individuos “hiper”(H) productores de Hsp70 disminuye con el grado de riesgo vascular de manera concomitante con la presencia del polimorfismo -326 A>C tal y como se recoge en la figura 6.8-2, lo que podría constituir un nuevo marcador de riesgo vascular.

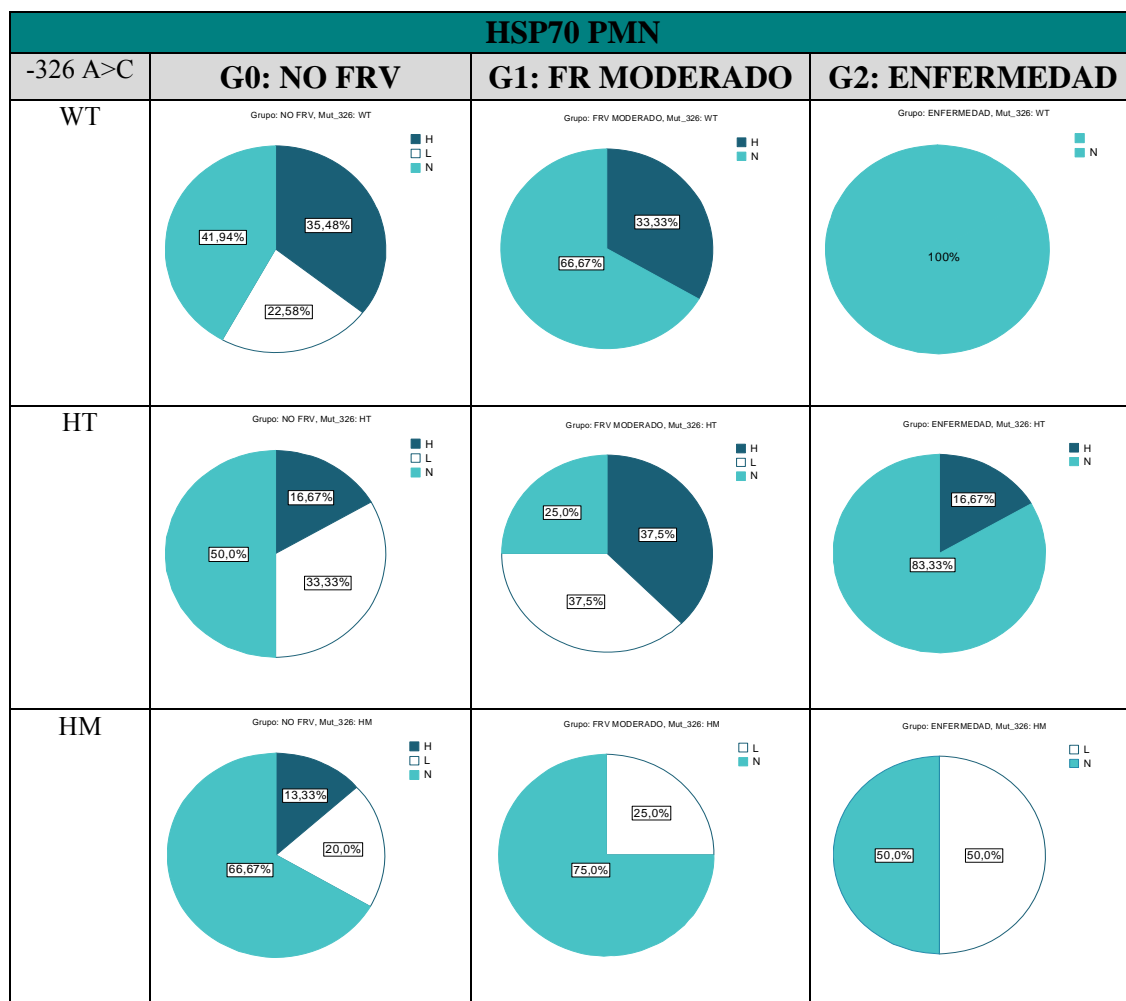


Figura 6.8-2 Producción (en %) de Hsp70 en PMNs por grupo de riesgo vascular y SNP -326 A>C
 Donde H: “hiper” productor, N: “normo”productor y L: “hipo” productor
 Donde: WT (salvaje), HT (Heterocigoto), HM (Homocigoto mutado)

El estudio de la biología de las Hsps en la enfermedad requiere estudios encaminados fundamentalmente a la localización de individuos que hayan padecido un evento vascular y que voluntariamente quieran participar en estos estudios, con objeto de aumentar el tamaño muestral del grupo de enfermedad y confirmar o descartar los resultados obtenidos.

7. RESUMEN

7. **RESUMEN**

La aterosclerosis, principal causa de enfermedad cardiovascular, constituye un complejo proceso inflamatorio crónico que se inicia con el daño celular a nivel del endotelio y termina con la formación de lesiones estratificadas en la pared arterial.

En respuesta a agentes aterogénicos como hipercolesterolemia, hábito tabáquico, resistencia a la insulina, agentes infecciosos o hiperhomocisteinemia, el endotelio se activa expresando moléculas de adhesión en su superficie, incrementando su permeabilidad a lipoproteínas, sintetizando y secretando citoquinas. Como consecuencia, leucocitos mononucleares migran y se adhieren a la pared del vaso, acumulándose lipoproteínas en el espacio subendotelial, cuya oxidación contribuye al proceso inflamatorio por activación de macrófagos, que a su vez sintetizan citoquinas y factores de crecimiento que promueven la atracción de células musculares lisas, estimulando la angiogénesis. La adhesión plaquetaria a la superficie endotelial y la secreción de quimiocinas y factores de crecimiento contribuye a la migración de células musculares lisas desde la media a la íntima, estimulando la producción extracelular de proteínas de la matriz. La formación de la capa fibrosa que rodea el ateroma y la continua acumulación lipídica por macrófagos da lugar a la formación de células espumosas. Dependiendo del espesor de la capa fibrosa se producirá la ruptura, con la consiguiente exposición del core necrótico del ateroma a la sangre, agregación plaquetaria con trombosis y potencial infarto.

La ausencia de factores de riesgo clásicos, no previene de accidentes cardiovasculares.

La hiperhomocisteinemia se considera factor de riesgo vascular independiente y se relaciona con la presencia de genotipo homocigoto mutado para la 677C>T de la MTHFR.

En la aterosclerosis los niveles elevados de Hsp70 intracelulares que poseen propiedades antiinflamatorias, se han relacionado con el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, y se asocia al genotipo salvaje para los SNPs -326 A>C y -27G>C del promotor del gen *hsp70*. Niveles disminuidos de Hsp70 en PMN se asocian con genotipo mutado.

Ante la agresión celular y/o daño endotelial, la célula responde activando los genes que codifican Hsps, lo que lleva a un incremento en la síntesis de Hsp70 intracelulares. La sobreexpresión de Hsp70 intracelular daría lugar a un incremento en el transporte a la membrana y su extravasación celular, alcanzándose un equilibrio transmembrana. Así las Hsp70 circulantes podrían reflejar la situación de las Hsp70 intracelulares.

Con la progresión de la enfermedad, se produciría un aumento de proteasas como metaloproteinasa 9 y/o elastasa, que pudieran provocar la degradación de las Hsp70 intracelulares, disminuyendo sus niveles.

Las Hsp70 juegan un importante papel en la protección celular frente al daño isquémico, de forma que niveles elevados de Hsp70 podrían reducir la adhesión plaquetaria en la inflamación. Los anticuerpos se han relacionado con el desarrollo y pronóstico de la aterosclerosis, de forma que al aumentar las Hsp70 intracelulares y séricas, disminuirían los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, lo que implicaría un mejor pronóstico

Resultados parciales de este trabajo, han sido comunicados a diversos congresos, y han sido objeto de algunas publicaciones^{391,392,393,394,395,396,397,398,399,400}.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Una vez finalizado el análisis de la población sometida a estudio, formada por individuos *a priori* sanos, teniendo en cuenta que el 62,6% de los individuos presenta hipercolesterolemia, el 13% HTA y que el 25,21% de los sujetos quedaron clasificados en el grupo G1 con factor de riesgo moderado, podemos concluir que:

- 8.1 El 12% de la población global estudiada presenta hiperhomocisteinemia moderada.
- 8.2 Los individuos con factores de riesgo vascular presentan valores de tHcy superiores que los individuos del grupo sin factores de riesgo vascular (G0), con significación estadística.
- 8.3 Los individuos homocigotos mutados para la 677C>T, presentan niveles de tHcy superiores a los individuos HT y WT, sin que alcance significación estadística. La frecuencia del genotipo TT para la 677C>T en los grupos de riesgo vascular moderado (G1) y con enfermedad (G2) es significativamente superior que en el grupo sin riesgo vascular (G0). Los niveles de tHcy aumentan con la edad exclusivamente en los individuos heterocigotos (CT) para la 677C>T.
- 8.4 El aumento de Hsp70 intraleucocitaria, protege del desarrollo de aterosclerosis. Las mujeres de nuestro estudio presentan Hsp70 superiores a los varones. Los individuos del G1 presentan los mayores niveles de Hsp70 en PMN, siendo las mujeres las que presentan los niveles más altos. Los varones del G2 presentan los valores más bajos de Hsp70 en PMN, por lo que éstos tendrían peor pronóstico cuando desarrollen la enfermedad. El aumento de Hsp70 en PMN en sujetos del G0, en ausencia de factores de riesgo clásicos, podría ser indicativo de inicio de agresión celular, con posible aumento de riesgo vascular.
- 8.5 Los individuos TT para la 677C>T presentan los niveles más altos de tHcy y de Hsp70 intraleucocitaria.
- 8.6 Las Hsps circulantes no aportan información como marcador de riesgo vascular, ya que parece que no tiene relevancia clínica en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, pero sin embargo podrían reflejar el balance entre las Hsp70 secretadas por arterias sanas y las Hsp70 secretadas por la placa de ateroma.
- 8.7 Los sujetos con riesgo vascular moderado (G1) presentan la menor concentración de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes y se demuestra correlación estadísticamente significativa ($p<0,01$) con los niveles de tHcy.

- 8.8 La correlación inversa existente entre Hsp70 PMNs y anticuerpos anti-Hsp70 circulantes en el G1, sugiere el mecanismo propuesto como plausible.
- 8.9 Los sujetos del G2 presentan niveles más bajos de Hsp70 circulantes y en consecuencia niveles más altos de anticuerpos anti-Hsp70 y anti-Hsp60.
- 8.10 Los varones tienen tendencia a presentar Hsp70 séricas superiores que las mujeres, a lo largo de todos los grupos de factor de riesgo, lo que sucede especialmente en el G2.
- 8.11 Los individuos homocigotos mutados para los SNPs 677C>T del gen de la MTHFR y – 326 A>C del gen *hsp70*, se considerarían sujetos con un mayor riesgo vascular ya que en ellos se demuestra correlación entre el aumento de tHcy con un aumento de anticuerpos anti-Hsp70 circulantes, en respuesta a la síntesis de Hsp70 producida como consecuencia del posible daño vascular.
- 8.12 El fenotipo “hiper” productor de Hsp70 intracelular, se consideraría protector de enfermedad.
- 8.13 Aquellos individuos “hipo” productores de Hsp70 intracelulares en G1, tendrían mayor riesgo.
- 8.14 El estudio del fenotipo de Hsp70 junto con el genotipo para el promotor del gen *hsp70* podrían utilizarse como factor pronóstico de predicción de evolución de la enfermedad, que junto con el estudio de la tHcy permitiría la identificación de factores de riesgo que pudieran ser modificables.
- 8.15 La menor concentración de anticuerpos anti-Hsps en el grupo de enfermos con aterosclerosis instaurada puede deberse a la formación de inmunocomplejos, mecanismo que podría ser objeto de futuras investigaciones.

9. PROPUESTA

9. PROPUESTA PARA EVALUACIÓN DE RIESGO VASCULAR

El conocimiento de nuevos marcadores que sirvan de herramienta para clasificar de forma individual a un sujeto y poder predecir su nivel de riesgo vascular, ha sido objeto de numerosos trabajos, ya que conocer el estado de salud cardiovascular de la población y la posibilidad de ejercer una acción intervencionista ante un riesgo elevado, podría llevar a una disminución en el número de fallecimientos que se producen por enfermedad cardiovascular, lo que constituye un problema de salud pública.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se propone la evaluación de un potencial riesgo vascular, considerando los factores de riesgo clásicos conjuntamente con los marcadores objeto de estudio.

Así, una vez haya sido clasificado el individuo aplicando la carta de la *Task Force*, en grupos de riesgo vascular, aplicar una segunda carta teniendo en cuenta los niveles de tHcy, HSP70 intracelular y la presencia/ausencia de SNPs para la -326 A>C del promotor del gen *hsp70*.

La carta que se propone se recoge en la figura 9-1, de forma que un individuo sin factores de riesgo clásicos (perteneciente al G0), con niveles de tHcy bajos (L), homocigoto normal para la mutación -326 A<C y niveles elevados de Hsp70 intracelulares (H), tendría un bajo riesgo de presentar un futuro evento cardiovascular, mientras que un individuo del G2, con hiperhomocisteinemia, homocigoto mutado para la -326 A>C y bajo productor de Hsp70 intracelular (L), tendría un alto riesgo de presentar un evento cardiovascular

-326 A >C		WT			HT			HM		
% Hsp70 PMNs		H	N	L	H	N	L	H	N	L
	G2									
	G1									
	G0									
tHcy		L	N	H	L	N	H	L	N	H

Figura 9-1. Estimación de riesgo. Donde Verde: bajo, Amarillo: medio, Naranja: elevado y Rojo: alto

La cuantificación del riesgo en porcentaje, no se ha realizado, básicamente por dos razones: 1) Es necesario aumentar el tamaño muestral, 2) Ausencia de un modelo matemático aplicable, que pondere correctamente los factores a incluir.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. American Heart Association. 2002 heart and stroke statistical update: Dallas TX: American heart Association, 2001.
2. Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease in 1990. In: Murray CJL, Lopez AD, eds. A comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, MA: Harvard School of Public Health, 1996:247-293.
3. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte 2002. Madrid: Instituto Nacional de Estadística. 2005.
4. Banegas JR, Villar F, Graciano A, Rodríguez-Artalejo F. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006; 6:3G-12G.
5. Versalius A. *De Humani Corporis Fabrica Libri Septem*. Basel 1543.
6. Lobstein JF. *Lehrbuch der Pathologischen Anatomie*, 2. Bd. Stuttgart: Fr. Brodhagische Buchhandlung, 1835.
7. Rokitsansky C. *Lehrbuch der Pathologischen Anatomie*. Volume 2. *Specielle Pathologische Anatomie*. Wien: W Braumeller, 1856:305-15.
8. Virchow R. *Gesammelte Abhandlung zur Wissenschaft-lichen Medicin*. Frankfurt: Meidinger, 1856:499-513.
9. Aschoff L. *Lectures in pathology*. New York: Hoeber, 1924:131-53.
10. Ignatowsky MA. Influence de la nourriture animale sur l'organisme des lapins. *Arch med Exp Anat Pathol* 1908;20:1-20.
11. Newburgh LH, Clarkson S. The production of atherosclerosis in rabbits by feeding diets rich in meat. *J Am Med Assoc* 1923;31:653-76.
12. Newburgh LH, Marsch PL, Clarkson S, Curtis AC. The dietetic factors in the etiology of chronic nephritis. *J Am Med Assoc* 1925;85:1703-5.
13. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic Heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:S1-9.
14. Steinberg D. Thematic review series: the patogenesis of atherosclerosis. An interpretative history of the cholesterol controversy, part I. *J. Lipid Res* 2004;45:1583-93.
15. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:299-309.
16. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
17. Maciejko JJ. *Atherosclerosis Risk Factors*. AACC Press. American Association for Clinical Chemistry. 2004. ISBN 1-59425-004-9.
18. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995;332:512-521.
19. Gibson GH. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. *Am J Hypertens* 1998;11:1775-1815.
20. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherosclerosis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:471-4.
21. Camejo G, Hurt -Camejo E, Wiklund O et al. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: Pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998;139:205-22.
22. Hermann RA, Malinauskas RA, Truskey GA. Characterization of sites with elevated LDL permeability at intercostals, celiac and iliac branches of the normal rabbit aorta. *Arterioscler Thromb* 1994;14:313-323.
23. Fernández-Ortiz A, Fuster V. Pathophysiology of coronary artery disease. *Clin Geriatr Med* 1996;12:1-21.
24. Griendling KK, Alexander W. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997;96:3264-65.
25. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits: II. Selective retention of LDL vs selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 1989;9:908-18.
26. Kruth HS. The fate of lipoprotein-cholesterol entering the arterial wall. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:246-252.
27. Brown WV. Atherosclerosis: risk factors and treatment. In: Braunwald E, ed. *Essential atlas of heart diseases*, 2nd edition. New York: McGraw-Hill, 2000:1-39.
28. Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1995;115:201-15.

29. Schmitt-Ott KM, Kagiya S, Philips I. The multiple actions of angiotensine II in atherosclerosis. *Regul Pept* 2000;93:65-77.
30. Topper JN, Cai J, Falb D et al. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10417-22.
31. Erl W, Weber PC, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis* 1998;136:297-303.
32. Mehta A, Yang B, Khan S, Hendricks JB, Stephen C, Mehta JL. Oxidized low density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium-dependent relaxation: Role of P-selectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2076-83.
33. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 1997;272:22975-78.
34. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-90.
35. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B et al. Angiotensine II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Circulation* 1999;100:899-902.
36. Silverstein RL, Febbraio M. CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:483-91.
37. Nagase M, Abe J, Takahashi K, Ando J, Hirose S, Fujita T. Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *J Biol Chem* 1998;273:33702-7.
38. Kreiger M. The other side of scavenger receptors: Pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:275-280.
39. Huang YH, Schäfer-Elinder L, Wu R, Claesson HE, Frostegård J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 1999;116:326-331.
40. Cederholm A, Svenungsson E, Stengel D, Fei GZ, Pockley AG, Ninio E, Frostegård J. Platelet-activating factor-acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50(9):2869-76.
41. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.
42. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995;270:14214-19.
43. Frenete P, Wagner D. Adhesion molecules. *N Engl J Med* 1996;334:1526-29.
44. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13:197-204.
45. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-9.
46. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791.
47. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998;102:145-52.
48. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporarily limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98:1047-1054.
49. Beutler BA, Cerami A. Recombinant interleukin 1 suppresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *J Immunol* 1985;135:1041-50.
50. Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: Theory versus practice. *Circulation* 1999;100:1148-1150.
51. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165-2168.
52. Stemme S, Hla J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb* 1992;12:206-211.
53. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th-1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999;145:33-43.
54. Packard R, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and risk Prediction. *Clin Chem* 2008;54(1):24-38.

55. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
56. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
57. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
58. Geng Y-J, Wu Q, Muszynski M et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with intherferón-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1-beta. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 1996;16:19-27.
59. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-72.
60. Galis ZS, Sukhova GK, Lara MW et al. Increased expresión of matriz metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerosis plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-503.
61. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS et al. Inflammatory cytokines and oxidized ñow density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999;274:11924-9
62. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracelular matrix digestion. *Cir Res* 1994;75:181-9.
63. Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture. *Circulation* 2001;104:1878-80.
64. Galis ZS, Sukhova GK, Lara MW, Libby P. Increased expresión of matrix metalloproteinases and matrix drgrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;111:2768-75.
65. Dollery CM, Owen CA, Suknova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation* 2003;107:2829-36.
66. Leclrecq A, Houard X, Loyau S. Topology of protease activities reflects atherothrombotic plaque complexity. *Atherosclerosis* 2006;17:may.
67. Martin-Ventura JL, Nicolas V, Houard X. Biological significance of decreased HSP27 in human atherosclerosis 2006;26:1337-43.
68. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanism leading yo myocardial infarction: insdigts from studies of vascular biology. *Circulation* 1994;90:22126-46.
69. Cairols M, Castillo J, González-Juanatey JR, Mostaza JM, Pomar JL. Patogenia de la Aterosclerosis. Factores de Riesgo. *Rev Clin Esp* 2003;203:3-11.
70. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, end the risk of coronary heart disease: The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1971; 74:1-12.
71. Pearson TA, McBride PE, Millar NH, Smith SC. 27th Bethesda Conference: Matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 8, Organization of preventive cardiology service. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1039-1047.
72. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Simon DI, Welch GN, Upchurc GR et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;9:308-18.
73. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
74. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women eith average cholesterol levels.: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615-22.
75. MacMahon S, Rodgers A. The effects of blood pressure reduction in older patiens: an overview of five randomizd controlled trials in elderly hypertensives. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:967-78.
76. Jacobs DR,Jr., Adachi H, Mulder I, Kromhout D, Menotti A, Nissinen A et al. Cigarette smoking and mortality risk:twenty-five-year follow-up of the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1999;159:733-40.
77. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1979;241:2035-8.
78. Assmann G, Schulte H. The importance of triglycerides:results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Eur J Epidemiol* 1992;8 (Suppl 1):99-103.
79. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a metanalysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-63.

80. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
81. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998;98:839-44.
82. Finkelstein JD, Mudd HS, Laster FIK. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the mode of inheritance. *Science* 1964;146:785-7.
83. Mudd SH, Levy HL, Skovoy F. Disorders of transsulfuration. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic Molecular Bases of Inherited diseases*. New York: McGraw-Hill Inc;1995;p.1279-1327.
84. Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inher Metab Dis* 1998;21:738-47.
85. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(10):980-986.
86. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-50.
87. Blanco-Vaca F, Lopez N, Cuquet J, Mateo J. Patient presenting multiple consecutive venous and arterial thrombotic events despite intensive conventional treatment: response after normalization of plasma homocysteine and N-acetylcysteine therapy. *J Intern Med*. 2003;254:397-400.
88. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354:407-13.
89. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br Med J* 2002;325:1202-9.
90. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.
91. Córdoba A, Blanco Vaca F, González Sastre F. Hiperhomocisteinemia, un nuevo factor de riesgo cardiovascular: territorios vasculares afectados, papel en la patogénesis de la arteriosclerosis y trombosis y tratamiento. *Medicina Clínica* 1997; 109: 715-725.
92. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJ, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;355:517-22.
93. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
94. Sacco SE, Whisnant JP, Broderick JP, Phillips SJ, O'Fallon WM. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. *Stroke* 1991;22:1236-41.
95. Winkelmann BR, Hager J. Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence. *Pharmacogenomics* 2000;1:73-94.
96. Mueller JH. A new sulphur containing amino acid isolated from casein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1922;19:161-3.
97. Barrer G, Coiné FP. The amino acid methionine; constitution and synthesis. *Biochem J* 1928;22:1417-25.
98. Burtz LW, DuVigneaud V. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulphuric acid. *J Biol Chem*. 1932;99:135-42.
99. DuVigneaud V. A trail of research in sulphur chemistry and metabolism. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1952:25-56.
100. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, MacPartlin J, Johnston C, Engbaek F, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
101. Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples. *Anal Biochem* 2002;308:112-9.
102. Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 2005;337:271-7.
103. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 2005;52:408-15.
104. Glowacki R, Jakubowski H. Cross-talk between Cys-34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2004;279:10864-71.
105. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans: implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002;277:30425-8.

106. Mudd SH, Ebert MH, Schriver CR. Labile methyl group balances in the human the role of sarcosine. *Metabolism* 1980;29:707-20.
107. Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Perry J. Cobalamin-folate interaction. *Blood rev* 1990;3:211-215.
108. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
109. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998; 49: 31-62.
110. Wilcken DEL, Reddy SG, Gupta VJ, Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocistinuria. *Metabolism* 1983; 32: 363-70.
111. Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordoñez-Llanos J et al. A genomewide exploration suggest a new candidate gene et chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *AM J Hum Genet*, 2005; 76:925-33.
112. Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Valls C, Lambruschini N. Plasma total-homocysteine in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:172-175.
113. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:263-79.
114. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patines. *Clin Chem* 1997;43:690-692.
115. Rea IM, McMaster D, Woodside JV, Young IS, Archbold GPR, Linton T, Lennox S, McNulty H, Harnon DL, Whitehead AS. Community-living nonagenarians in Northern Ireland have lower plasma homocysteine but similar methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile genotype prevalence compared to 70-89-year-old subjects. *Atherosclerosis* 2000;149:207-214.
116. Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, Thomas CM et al. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995;25:801-5.
117. Morris MS, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Total homocysteine and estrogen status in the Third Nacional Health and Nutrition R examination Survery. *Am J Epidemiol* 2000;152(2):140-148.
118. Vilaseca MA. Causas de hiperhomocisteinemia. En *Homocisteína 1ª Reunión Nacional*. Segovia 2004. Dirigido por Blanco F, Chacón P, Deulofeu R, Dulin E. Ed Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. ISBN:84-89975-18-3.
119. Graus JP, Le K, Swaroop M, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE et al. Human cystationine-synthase cDNA: sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum Mol Genet* 1993;2:1633-8.
120. Córdoba Porras A, Blanco Vaca F, González Sastre F. Bases Moleculares de la hiperhomocisteinemia. *Química Clínica* 1998;17(1):5-18.
121. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B. et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *New Engl J Med.* 1991; 324:1149-55.
122. Weissbach H, Taylor R. Role of vitamin B12 in methionine of biosynthesis. *Fed Proc* 1966;25:1649-56.
123. Fenton AW, Rosenberg LE. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, dirs. *The Metabolic and Molecular Bases of Inerithed Disease*. New York: McGraw-Hill Inc;1995:p. 3111-28.
124. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folato transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, dirs. *The Metabolic and Molecular Bases of Inerithed Disease*. New York: McGraw-Hill Inc;1995:p. 3111-28.
125. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenger J, Shane B. Human methionine syntase cDNA cloninc, gene localization, and expression. *J Biological Chemistry* 1997;272:3628-34.
126. Goyete P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt D, Mathews R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1994;7:195-200.
127. Goyete P, Sumner J, Milos R, Duncan A, Rosenblatt D, Mathews R. Isolation of a cDNA for human methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and identification of mutation in MTHFR-deficient patiens. (Abstract) *Am J Hum Genet* 1993;(suppl): A153.
128. Goyete P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 1996;59:1268-75.
129. Goyete P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995;56:1052-9.
130. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisy J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabil variant of methylenetetrahydro reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-21.
131. Rosenblatt DS, Erbe RW. Methylenetetrahydrofolate reductase in cultured human cells. I. Growth and metabolic studies. *Pediatr Res* 1977;11:1137-41.

132. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyete P, Shepard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kuijman LAJ, van den Heuvel LP, Rozen E. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
133. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlind M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frias ML, Erikson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andrea G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR): findings from over 7000 newborns from world wide. *J Med Genet* 2003;40:619-625.
134. Ubbick JB, Vermaak WJ, van der Merwe, Becker PJ. Vitamin B12, Vitamin B6 and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993;57:47-53.
135. Selhub J, Jacques P, Wilson P, Rush D, Rosenberg I. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-8.
136. Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamina, choline, riboflavin, and troloxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989;75:1-6.
137. Conner SL, Ojeda LS, Sexton G, Weidner G, Conner WE. Diets lower in folic acid and carotenoids are associated with the coronary disease epidemic in Central and Eastern Europe. *J Am Diet Assoc* 2004;104:1793-9.
138. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. In: Gotto AM Jr, Paoletti R, editors. *Atherosclerosis reviews*, vol 11. New York: Raven Press, 1983:157-246.
139. Nakazawa Y, Chiba K, Imatoh N, Kotorii T, Sakamoto T, Ishizaki T. Serum folic acid levels and antipyrine clearance rates in smokers and non-smokers. *Drug Alcohol Depend* 1983;11:201-207.
140. Stickel F, Choi SW, Kim YI, Bagley PJ, Seitz HZ, Russell RM, Selhub J, Mason JB. Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:259-64.
141. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine. The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:136-143.
142. Hermann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3):131-6.
143. Su TCh, Jeng JSh, Wang JD, Torng PL, Chang SJ, Chen ChF, Liao ChS. Homocysteine, circulating vascular cell adhesion molecule and carotid atherosclerosis in postmenopausal vegetarian women and omnivores. *Atherosclerosis* 2006;184:356-362.
144. Ambroszkiewicz J, Klemarczyk W, Chelchowska M, Gajewska J, Laskowska-Klita T. Serum homocysteine, folate, vitamin B12 and total antioxidant status in vegetarian children. *Adv Med Sci* 2006;51:265-8.
145. Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Valls C, Lambruschini N. Plasma total-homocysteine in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:172-175.
146. Lindenbaum J. Aspects on vitamin B12 and folate metabolism in malabsorption syndromes. *Am J Med* 1979;67:1037-48.
147. Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, Nadeau MR, Jacques PF, Selhub J, Dworkin L, Rosenberg IH. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2554-8.
148. Kahleova R, Palyzova D, Zvara K, Zvarova J, Hrach K, Novakova I et al. Essential hypertension in adolescents: association with insulin resistance and with metabolism of homocysteine and vitamins. *Am J Hypertens* 2002;15:857-64.
149. Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O. Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism* 1998;47:89-93.
150. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991;51:828-35.
151. Ono H, Sakamoto A, Eguchi T. Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. *Metabolism* 1997;46:959-962.
152. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
153. McCully KS. Homocysteinemia and arteriosclerosis. *Am Heart J* 1972;83:571-3.
154. McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975;22:215-27.

155. McCully KS, Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Am J Pathol* 1970;61:1-11.
156. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary heart disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976;57:1079-82.
157. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995;274:1049-57.
158. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775-1781.
159. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J, D'Agostino RB, Wolf PA, et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999; 159:1077-1080.
160. Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998; 158:862-867.
161. Ridker PM, Shih J, Cook TJ, Clearfield M, Downs JR, Pradhan AD et al, for the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) Investigators. Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation* 2002;105: 1776-1779.
162. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of epidemiologic evidence. *Am Intern Med* 1999;131:363-75.
163. The homocysteine Studies Collaboration Homocysteine and risk of ischemic Herat disease and strok: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.
164. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 98:204-210.
165. Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, Refsum H, Ueland PM. Plasma total homocysteine and hospitalizations for cardiovascular disease: the Hordaland homocysteine study. *Arch Int Med* 2002;162:1374-1381.
166. Casals FJ, Deulofeu R. Hiperhomocisteinemia moderada: un nuevo factor de riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1995; 7: 106-119.
167. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274:1526-33.
168. Vila N, Deulofeu R, Chamorro A, Piera C. Concentraciones plasmáticas de homocisteína en pacientes con infarto cerebral isquémico. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 605-608.
169. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Tanizaki Y, Ueno H, Kimura Y, et al. Plasma homocysteine concentrations and the risk of subtypes of cerebral infarction . The Hisayama Study. *Cerebrovasc. Dis* 2002; 13: 9-15.
170. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 144: 473-501.
171. Jacques PF, Boston AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determination of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001;73:613-21.
172. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA* 2003;289:1251-1257.
173. Nygard O, Nordrehaug JE Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1997;337:230-236.
174. Stubbs PJ, Al-Obaidi MK, Conroy R, et al. Effect of plasma homocysteine concentration on early and late events in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;102:605-610.
175. Matetzky S, Freimark D, Ben-Ami S, Goldenberg I, Leor J, Doolman R. Association of elevated homocysteine levels with a higher risk of recurrent coronary events and mortality in patients with acute myocardial infarction. *Arch Intern Med.* 2003;163:1933-1937.
176. Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, Park R, Aziz DC, Budoff MJ. Plasma homocysteine predicts progresión of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005;181:159-165.
177. Sundström J, Vasan RS. Homocysteine and heart failure: a review of investigations from the Framingham Heart Study. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(10):987-992.

178. Alvarez-Sabín J, Turón J, Montaner J. Niveles plasmáticos de homocisteína en pacientes con accidentes isquémicos transitorios. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 531-532.
179. Vermeer SE, Den Heijer T, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Incidence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke* 2003; 34: 392-396.
180. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-291.
181. Rosengarten B, Osthaus S, Auch D, Kaps M. Effects of acute hyperhomocysteinemia on the neurovascular coupling mechanism in healthy young adults. *Stroke* 2003; 34: 446-451.
182. Boysen G, Brander T, Christensen H, Gideon R, Truelsen T. Homocysteine and risk of recurrent stroke. *Stroke* 2003; 34: 1258-1261.
183. Madona P, de Stefano V, Coppola A, Cirillo F, Cerbone AM, Orefice G, et al. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33: 51-56.
184. Li Z, Sun L, Zhang H, Liao Y, Wang D, Zhao B, et al. Elevated plasma homocysteine was elevated in hemorrhagic and ischemic stroke but MTHFR gene polymorphism was a risk factor for thrombotic stroke: a Multicenter Case-Control Study in China. *Stroke* 2003; 34: 2085-2090.
185. Kluijtmans LA, Boers GH, Kraus JP, van den Heuvel LP, Cruysberg JR, Trijbels FJ. The molecular basis of cystathionine betasynthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. *Am J Hum Genet* 1999;65:59-67.
186. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation with risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279:359-64.
187. Merchant AT, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, Rimm EB, Ascherio A. The use of B vitamin supplements and peripheral arterial disease risk in men are inversely related. *J Nutr* 2003;133:2863-7.
188. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2002-6.
189. Clarke R, Armitage J. Vitamin supplements and cardiovascular risk: review of the randomized trials of Homocysteine-lowering supplements. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 34: e207.
190. Loon E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M et al. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1567-77.
191. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 565-575.
192. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Twerdal A, Steigen T et al. NORVIT trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1567-77.
193. Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine Hypótesis for Atherothrombotic Cardiovascular Disease. *JACC* 2006;48(5):914-23.
194. Zhou J, Wertuck GH, Lhotak S, de Koning AB, Sood SK, Hossain GS, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Falk E, Dayal S, Lentz SR, Austin RC. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;110(2):207-13.
195. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, et al. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *J Am Med Assoc* 1999;281:2113-8.
196. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999;99:1156-60.
197. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, et al. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor- α , NADPH oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:418-24.
198. Kerins DM, Koury MJ, Capdevilla A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001;174:723-9.

199. Lin PY, Yang TH, Lin HG, Hu ML. Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line. *Clin Chim Acta* 2007;379:139-144.
200. Clarke S, Banfield K. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. *Homocysteine in Health and Disease*. UK: Cambridge University Press, 2001:63-78.
201. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33-9.
202. Belardinelli L, Linden J, Berne RM. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovascular Dis* 1989;32:73-97.
203. Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Ischaemic preconditioning: from molecular characterization to clinical application. Part I, *Neth J Med* 2004;62:353-63.
204. Jackson EK. Adenosine: a physiological brake on rennin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1991;31:1-35.
205. Smits P, Lenders JW, Lambrou J, Willemsen JJ, Van Belle H, Thien T et al. Presynaptic inhibition of norepinephrine release from sympathetic nerve endings by endogenous adenosine. *Hypertension* 1996;27:933-8.
206. Minamino T, Kitakaze M, Asanuma H, Tomiyama Y, Shiraga M, Sato H et al. Endogenous adenosine inhibits P-selectin-dependent formation of coronary thromboemboli during hypoperfusion in dogs. *J Clin Invest* 1998;101:1643-53.
207. Burnstock G. Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:364-73.
208. Riksen NP, Ronden GA, Borres GH, Blom HJ, van den Broek PH, Smits P. Enhanced cellular adenosine uptake limits adenosine receptor stimulation in patients with hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:109-14.
209. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increase in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318-323.
210. Castro R, Rivera I, Struys EA, Cansen EE, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* 2003;49:1292-96.
211. Bönsch D, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber S, Bleich S. Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 2004;111(12):1611-6.
212. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999;13:2277-83.
213. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(10):1001-14.
214. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trciak W, Kazmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004;35:1299-304.
215. Danishpajoo IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR. Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flux through the folate pathway. *J Biol Chem* 2001;276:27296-303.
216. Juckett MB, Weber M, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury. *Free Radic Biol Med* 1996;20:63-73.
217. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Farhat M, Miled A, Maaroufi K, Trivin F. Hyperhomocysteinemia, Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism and risk of coronary Artery Disease. *Clin Chem* 2006;52(1):53-58.
218. Fatini C, Sofi F, Gori AM, Sticchi E, Marcucci R, Lenti M, Casini A, Surrenti C, Abbate R, Gensini GF. Endothelial nitric oxide synthase -786T>C, but not 894G>T and 4a4b, polymorphism influences plasma homocysteine concentrations in persons with normal vitamin status. *Clin Chem* 2005;51(7):1159-1164.
219. Böger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1467-72.
220. Böger RH. The emerging role of ADMA as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.
221. Drapier JC, Hibbs JB. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells-inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest* 1986; 78:790-797.
222. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
223. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333 : 664-666.

224. Palmer RMJ, Rees DD, Asthon DS, Moncada S. *Biophys Res Commun* 1988; 153: 1251.
225. McDermontt JR. Studies on the catabolism of NG-methyl-arginine, NG, NG-dimethylarginine and NG, N'-G-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976;154:179-84.
226. Böger RH, Lenz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Clin Sci* 2001;100:161-7.
227. Sydow K, Horning B, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Münzel T. Endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc Med* 2004;9:1377-83.
228. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia. Effects of L-arginine and B vitamins.
229. Young VR, Alexis SD, Baliga BS et al. Metabolism of administered 3-methylhistidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative. *J Biol Chem* 1972;247:3592-3600.
230. Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(10):1124-29.
231. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG, NG dimethylarginine and NG, NG dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 1987; 252:526-537.
232. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG, NG dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264:10205-10209.
233. MacAllister RJ, Parry H, Kimono M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119:1533-40.
234. Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GSTJ, Valance P. Induction of NG-monomethylarginine uptake. A mechanism for differential inhibition of NO synthases. *Am J Physiol* 1995;269:C750-C765.
235. Malandro MS, Kilberg MS. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:305-336.
236. Baldwin GS, Carnegie PR. Specific enzymic methylation of an arginine in the experimental allergic encephalomyelitis protein from human myelin. *Science* 1971;171:579-580.
237. Wang C, Lazarides E, O'Connor CM, Clarke S. Methylation of chicken fibroblast heat shock proteins at lysyl and arginyl residues. *J Biol Chem* 1982;257:8356-8362.
238. Lischwe MA, Cook RG, Ahn YS et al. Clustering of glycine and NG, NG dimethylarginine in nucleolar protein C23. *Biochemistry* 1985;22:6025-6028.
239. Ghosh SK, Woon KP, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein and histone-specific enzymes. *J Biol Chem* 1988;263:19024-19033.
240. Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in isolated liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1992;1122:183-188.
241. Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastro* 2004;10:1699-1708.
242. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001;103(22):2717-23.
243. Dalal S, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S, Nicolaou A. Effect of homocysteine on cytokine production by human endothelial cells and monocytes. *Ann Clin Biochem* 2003;40:534-41.
244. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Keaney JF Jr et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-17.
245. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996;75:617-63.
246. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, et al. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 1995;5:2032-2036.
247. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokohama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic stress by taurine. *Circulation* 2001;104(10):1165-70.
248. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;13:1211-1233.
249. Szegherzi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2003;1010:186-94.

250. Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 2004;29:152-8.
251. Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:431-437.
252. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response a stress signalling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 2004;28:79-92.
253. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci* 2003;116:1861-1862.
254. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 2000;101:249-258.
255. Hwang C, Sinskey Aj, Lodisch HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992;257:1496-1502.
256. Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* 2004;15:767-76.
257. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein holding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 2004;164:341-6.
258. Ikesugi K, Yamamoto R, Mulhern L, Shinohara T. Role of the unfolded protein response (UPR) in cataract formation. *Experimental Eye Research* 2006;83:508-16.
259. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2000;275:32846-853.
260. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPR and ERS-II. *J Biochem* 2004;136:343-350.
261. Chan SL, Fu W, Zhang P, Cheng A, Lee J, Kokame K, Mattson MP. Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2004;279:28733-43.
262. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes Cells* 2004;9:457-69.
263. Sai X, Kawamura Y, Kokame K. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 2002;277:12915-920.
264. Lenz B, Bleich S, Beutler S, Schlierf B, Schwager K, Reulbach U, Kornhuber J, Bönsch D. Homocysteine regulates expression of Herp by DNA methylation involving the AARE and CREB binding sites. *Exp Cell Res* 2006;312:4049-55.
265. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimentia* 1962;18:571-3.
266. Lindquist SC y Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Gent* 1988;22:631-678.
267. Ray PK. Stress genes and species survival. *Mol Cell Biochem* 1999;196:117-123.
268. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 1990;265:12111-4.
269. Morimoto RI. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993;259:1409-10.
270. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein chaperoned peptides. *Science* 1995;269:1585-77.
271. Whitley D, Golberg SP, Jordan WD. Heat Shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999;29(4):748-51.
272. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003;362:469-76.
273. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:601-634.
274. Jäätelä M. Heat shock proteins as cellular lifeguard. *Trends Mol Med* 1999;31:261-271.
275. Frydman J, Nimmergern E, Ohtsuka K, Hartl F. Folding of nascent polypeptide chains in a higher molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 1994;370:111.
276. Mehta TA, Greenman J, Ettelaie, Venkatasubramaniam, Chetter IC, McCollum. Heat shock proteins in vascular disease. A review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:395-402.
277. Kiang JG and Tsokos GC. Heat Shock Protein 70kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol Ther* 1998;80(2):183-201.
278. Ciupitu A, Peterson M, O'Donnell C, Williams K, Jindal S, Kiessling R. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:685-91.
279. Beck CS, De Maio A. Stabilization of protein synthesis in thermotolerant cells during heat shock: Association of heat shock protein-72 with ribosomal subunits of polysomes. *J Biol Chem* 1994;269:21803-21811.

280. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.
281. Antonio de Maio. Heat Shock Proteins: Facts, Thoughts, and Dreams. *Shock* 1999;11(1):1-12.
282. Keller WL. Molecular chaperones: How J domains turn on HSP70s. *Curr Biol* 1999;9:R305-8.
283. Cascales M. Proteínas del estrés y carabinas moleculares. *Proyecciones clínicas y terapéuticas*. 2002.
284. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 1992;267:21987-21990.
285. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induce heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest* 1997;100:1089-97.
286. Lis J, Wu C. Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling and trucking along. *Cell* 1993;74:1-4.
287. Lamb DJ, El-Sankary W, Ferns GA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 2002;167:177-85.
288. Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI. Human heat shock factor 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp 70 gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:2087-99.
289. Feder JH, Rossi Jm, Solomon J, Solomon N, Lundquist S. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev* 1992;6:1402-13.
290. Schmidt JA, Abulla E. Down-regulation of IL-1 biosynthesis by inducers of the heat shock response. *J Immunol* 1988;141:2027-34.
291. Bellmann KA, Wenz A, Radons J, Burkart V, Leemann R, Kolb H. Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin. *J Clin Invest* 1995;95:2840-45.
292. De Vera ME, Wong JM, Zhou JY, Tzeng E, Wong HR, Billiar TR, Geller DA. Heat shock inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1238-45.
293. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1547-59.
294. Bornfeldt KE. Stressing Rac, Ras and downstream heat shock protein 70. *Circ Res* 2000;86:1101-3.
295. Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today* 1996;2:372-9.
296. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meir T, Wilmanns W. A stress-inducible 72 kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cell, but not on normal cells. *Int J Cancer* 1995;61:272-9.
297. Andrés D, Sanz N, Alvarez AM, Díez-Fernández C, Zaragoza A, Cascales M. HSP70 induction by CsA in cultured hepatocytes. Effect of vitamin E succinate. *J Hepatol* 2000;33:570-9.
298. Marber MS, Latchman DS, Walter JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-72.
299. Radford NB, Fina M, Benjamín IJ et al. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2339-42.
300. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998;98(4):300-7.
301. Khan IU, Tallin R, Gupta RS, Kammer GM. Protein Kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the lymphocyte plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10425-30.
302. Metzler B, Mayr M, Dietrich H, Sing M, Wiebe E, Xu Q, Wick G. Inhibition of arteriosclerosis by T-cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunised with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1905-11.
303. Lamb DJ, Tickner ML, Dreux AC, El-Sankary W, Hourani S, Eales-Reynolds L, Ferns G. Impairment of vascular function following BCG immunisation is associated with immune response to HSP-60 in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 2004;172:13-20.
304. Bobryshew YV, Lord RS. Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2002;35(2):368-375.
305. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001;22(12):665-9.
306. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (HSP60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones* 1999;4(1):29-35.
307. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (HSP70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 1998;27(6):367-377.

308. Xu Q, Schett G, Perschinka H. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000;102(1):14-20.
309. Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegard J. Circulating heat shock proteins and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens* 2002;20(9):1815-20.
310. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 2003;42(3):235-8.
311. Knoflach M, Kiechl S, Kind M. Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in young males: ARMY study (atherosclerosis risk-factors in male youngsters). *Circulation* 2003;108(9):1064-69.
312. Hoppichler F, Koch T, Dzien A, Gschwandtner G, Lechleitner M. Prognostic value of antibody titre to heat shock protein 65 on cardiovascular events. *Cardiology* 2000;94(4):220-3.
313. Auffray C, Strominger JL. Molecular genetics of the human major histocompatibility complex. *Adv Hum Genet* 1986;15:197-247.
314. Thompson and Thompson. *Genética en Medicina*. 4ª Edición. Ed: Thompson MW, McInnes RR, Willard H. Publicada por WB Saunders Company 1996. ISBN: 84-458-0418-9.
315. Goate AM, Cooper DN, Hall C, Leung TKC, Solomon E, Lim L. Localization of a human heat-shock hsp-70 gene sequence to chromosome-6 and detection of 2 other loci by somatic-cell hybrid and restriction-fragment-length polymorphism analysis. *Hum Genet* 1987;75:123-8.
316. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, and Campbell D. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:1968-1972.
317. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990;32(4): 242-251.
318. Temple S, Cheong KY, Ardlie KG, Sayer D, Waterer GW. The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. *Intensive Care Med* 2004;30:1761-67.
319. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6455-6459.
320. Shimizu S, Nombra K, Ujihara M, Demura H. An additional exon of stress-inducible heat shock protein 70 gene (HSP70-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257(1):193-198.
321. Jenkins SC, March RE, Campbell RD and Milner CM. A novel variant of the MHC-linked hsp70, hsp70-hom, is associated with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2000;56:3.
322. Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992;36:357-362.
323. Favatier F, Jacquier-Sarlin MR, Swierczewski E, Polla BS. Polymorphism in the regulatory sequence of the human hsp70-1 gene does not affect heat shock protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:701-708.
324. Bogunia-Kubik K, Koscińska K, Suchnicki K, Lange A. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *J Immunogen* 2006;33:135-140.
325. Han Z, Troung QA, Park Sh, and Breslow JL. Two Hsp70 family members expressed in atherosclerotic lesions. *PNAS* 2003;100(3):1256-1261.
326. Waterer GW, ElBahawan L, Quasney MW, Zhang Q, Kessler LA, Wunderink RG. Heat shock protein 70-2+1267 AA homozygotes have an increase risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2003;31:1367-72.
327. Pae Ch, Kilt, Kwon O, Artoli P, Serreti A, Lee Ch, Lee S, Lee Ch, Paik I, Kim J. Polymorphisms of heat shock protein 70 gene (HSPA1A, HSP1B and HSPA1L) and schizophrenia. *Neuroscience Res* 2005;53:8-13.
328. Favatier F, Bornean L, Hightower LE, Gunter E, Polla BS. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance?. *Cell Stress Chaperones* 1997;2:141-55.
329. Ross OA, Curran MD, Crum KA, Maeve Rea I, Barnett YA, Middleton D. Increased frequency of the 2437T allele of the heat shock protein 70-Hom gene in an aged Irish population. *Exp Gerontol* 2003;38:561-565.
330. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr., Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;100:1481-92.
331. Word D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyörälä K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and others Societies on Coronary Prevention. *Atherosclerosis* 1998;140:199-270.
332. Gordon T, Kannel WB. Multiple risk functions for predicting coronary heart disease: the concept, accuracy and application. *Am Heart J* 1982;103:1031-9.

-
-
333. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
334. D'Agostino Sr RB, Gruñid SM, Sullivan LM, Wilson P. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA* 2001;286:180-7.
335. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene area associated with susceptibility to acute leucemia in adults. *PNAS* 1999;96(22):12810-12815.
336. González Buitrago JM. Técnicas de diagnóstico molecular. En: *Patología Molecular*. González de Buitrago JM, Medina Jiménez JM dirs. McGraw-Hill. Interamericana. 2001 p:21-47
337. Packard R, Lobby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and risk Prediction. *Clin Chem* 2008;54(1):24-38.
338. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83:456S-60S.
339. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002;110:905-11.
340. Gewurz H, Mold C, Diegel J, Fiebel B. C-Reactive Protein and the acute Phase Response Advances. In: *Internal Medicine* 1982;27:345-372.
341. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003;107:363-9.
342. Kaul S, Zadeh AA, Shah PH. Homocysteine Hypothesis for Atherothrombotic Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:914-23.
343. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1055-9.
344. Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, Bond MG. Differential distributions of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potencial role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:27-36.
345. Beresford SAA and Boushey CJ. Homocysteine, Folic Acid, and Cardiovascular Disease Risk. From: *Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals*. Edited by A.Bendich and RJ Deaklbaum Ilumana Press In., Totowa, NJ. Cap 11:193-224.
346. Deulofeu R. Aspectos técnicos de la determinación de la homocisteína total en plasma. En *Homocisteína*. Dirigido por Blanco F, Chacón P, Deulofeu R, Dulin E. Ed: Comité depublicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica y Patología Molecular. ISBN:84-89975-18-3. 2005.
347. Petersen PH, Fraser CG, Jorgensen L, Brandslund I, Stahl M, Gowans E, et al. Combination of analytical quality specifications based on biological with-in and between subject variation. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 543-50.
348. Blanco Vaca F, Deulofeu R, Vilaseca M^aA, Chacon P, Dulin E. Por el Grupo de trabajo sobre hiperhomocisteinemia de la SEQCPM. Determinación de homocisteína en plasma: metabolismo, metodología, interpretación de resultados y papel en la evaluación del riesgo vascular. *Quim Clinica*, 2002;21: 243-50.
349. Dulin Iñiguez, E., Bueno Zamora*, H., Martín Calderón, JL., García Serrano C., Herranz Robles A. Evolución de los niveles de homocisteína total (tHcy), tras infarto agudo de miocardio (IAM). Estudio Preliminar. *Química Clínica* 1999;18(2): 97
350. Third Report of the Nacional Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Colesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002;106:3143-.
351. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
352. Ridker PM, Buring JE, Cook NR. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-7.
353. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M et al. Markers of Inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centres for Disease Control and Prevention and the American Herat Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
354. Ueland PM, Clarke R. Homocysteine and Cardiovascular Risk: Considering the Evidence in the Context of Study Desing, Folate Fortification, and Statistical Power. *Clin Chem* 2007;53 (5):807-9.
355. Clarke R, Collins R, Lewington S, Donald A, Afthan G, Tuomilehto J. Homocysteine and risk of ischemic Herat disease and stroke: a metaanalysis. *JAMA* 2002;288:2015-22.

356. Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, Michel JB. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis* 2007;194(2):334-41
357. Vayssier-Taussat M, Camilla T, Aron Y, Replan C, Hainaut P, Polla B, Weksler B. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1293-H1300.
358. Hooper PL, Hooper JJ. Is Low-Heat Shock Protein 70 a Primary or Secondary Event in the Development of Atherosclerosis. Letters to the Editor. *REVISTA AÑO*.
359. Martin-Ventura JL, Leclercq A, Blanco-Colio LM, Egido J, Rossignol P, Meilhac O, Michel JB. Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis* 2006; In press
360. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1055-9.
361. Svenson PA, Asea A, Englund MCO, Bausero A, Jernas M et al. Major role of HSP70 as a paracrine inducer of cytokine production in human oxidized LDL treated macrophages. *Atherosclerosis* 2006;185:32-38
362. Jin X, Wang R, Xiao Ch, Cheng L, Wang F, Yang L et al. FERUM and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population. *Cell Stress & Caserones* 2004;9(1):69-75.
363. Kanwar RK, Kanwar JR, Wang D, Ormrod DJ, Krissansen GW. Temporal expresión of heat shock proteins 60 and 70 at lesion-prone sites during atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1991-7.
364. Shin YO, Bae JS, Lee JB, Kim JK, Kim YJ, Kim HK, Ahn JK, Bang IK, Lee BK, Toman T, Min YK and Yang HM. Effect of Cardiac Rehabilitation and Statin Treatment on Anti-Hsp Antibody Titers in Patients with Coronary Artery Disease After Percutaneous Coronary Intervention. *Int Heart J* 2006;47:671-682.
365. Ghayour-Mobarhan M, Lamb DJ, Vaidja N, Livingstone C, Wang T, Ferns GA. Heat shock protein antibody titers are reduced by statin therapy in dyslipidemic subjects: a pilot study. *Angiology* 2005;56(1):61-8.
366. Guisasaola MC, Dulin E, Almendral J, García-Barreno P. Reduction of Heat Shock Protein Antibody Levels by Statin Therapy. *Lipids* 2008 Nov 26. [Epub ahead of print].
367. Sánchez Marín B, Grasa JM. Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en la patología isquémica vascular. *Revista de Neurología* 2006;43(10):630-636.
368. Jacques PF, Boston AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
369. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-6.
370. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C>T polymorphism and coronary Heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potencial of folate?. *BMJ* 2005;331:1053.
371. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Ignoran AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link mendelian randomisation. *Lancet* 2005;365:224-32.
372. Kluijtmans L, Va den Heuvel L, Borres G, Frosst Ph, Stevens E, Oost B, Heijer M, Trijbels F, Rozen R, Blom H. Molecular Genetic Análisis in Mild Hyperhomocysteinemia: A Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Is a Genetic Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Am J Hum.Genet* 1996;58:35-41.
373. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sciences* 2001;22 (4):195-201.
374. Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Wilhelm F et al. The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20:584-92.
375. Botto LD and Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
376. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. CDC. Variantes del gen MTHFR y los defectos congénitos. <http://www.cdc.gov/ncbddd> . Visitado 26 de febrero de 2008.

377. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum genet* 1998;62:1258-60.
378. Bathum L, Petersen I, Christiansen L, Konieczna A, Sorensen TIA et al. Genetic environmental influences on plasma homocysteine: results from a Danish twin study. *Clin Chem* 2007;53:971-9.
379. Guillén M, Corella D, Portolés O, González JJ, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17:255-261.
380. González B, Perez B, Santiuste C, Desviat LR, Ugarte M, Pérez ML, et al. Estudio del polimorfismo C677T del gen MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína. *Quim Clin* 2005;24(1):41-45.
381. Kerkeni M, Adda F, Chauffert M, Myara A, Gerhardt M, Chevenne D, Trivin F et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem* 2006;43:200-206.
382. Serin E, Güçlü M, AtaÇ F, Verdi H, KayaselÇuk F, Özer B, Bilezikli B, Yilmaz U. Methylenetetrahydrofolate reductase C677Y Mutation and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig.Dis.Sci* 2006;.
383. Verbeke P, Fonager J, Clark BFC, Rattan SIS. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol Int* 2001;25:845-857.
384. Matouschek A. Protein unfolding – an important process “in vivo”. *Current Opinión in Structural Biology* 2003;13:98.
385. Asea A, Kraeft SK, Kart-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine* 2000;6:435.
386. Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Internacional Journal of Hyperthermia* 2002;18:576.
387. Rea IM, McNerlan S, Pocley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:341-352.
388. Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes-mellitus (IDDM). *Scandinavian J Immunol* 1993;38(5):491-495.
389. Sing R, Kolvraa S, Bross P, Jensen UB, Gregensen N, Tan Q, Knudsen C, Rattan SIS. Reduced heat shock response in human mononuclear cells during aging and its association with polymorphisms in HSP70 genes. *Cell Stress & Caperones* 2006;11(3):208-215.
390. Piglowski W, Nowak R, Krawczyk Z and Scieglinska. The structural and functional analysis of the human HSPA2 gene promoter region. *Acta Bioquímica Polonica* 2007;54(1):99-106.
391. Dulin E, Guisasola MC, Desco MM, Suárez A, García-Barreno P. Hyperhomocysteinemia and Heat Shock Proteins. Epidemiological Study in a General Population. 47th ASH Annual Meeting. *Blood* 2005;106: Abstract 4107.
392. Guisasola MC, Dulin E, Desco MM, Suárez A, Asensio F, Tavares P, Goicoechea U, Sánchez MJ, García-Barreno P. Epidemiology of vascular risk factors: Correlation with circulating Hsp70 and Hsp70 antibodies. 2nd International Congress on Stress responses in Biology and Medicine. Tomar-Portugal, september 24-26,2005.
393. Guisasola MC, Dulin E, Desco MM, Suárez A, García-Barreno P. Epidemiological study of polymorphisms of *hsp70i* promoter and its expression. *J Leukocyte Biology Supp* 2005:72.
394. Guisasola MC, Dulin E, Desco MM, Suárez A, García-Barreno P. Epidemiological study of polymorphisms of *hsp72* promoter and its expression. 5th International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses. Concepción, Chile, March 21-26, 2006.
395. Dulin-Iñiguez E, Guisasola-Zulueta MC, Desco-Menendez MM, Sánchez-Fernández MJ, García-Barreno P. Relation between Homocysteine and Heat Shock Proteins in general population. *Atherosclerosis* 2006;7(3):276.
396. Guisasola MC, Dulin E, Desco MM, Suárez A, Sánchez MJ, García-Barreno P. Epidemiology of vascular risk factors and Heat Shock Proteins. Genomic and Proteomic. European Society of Cardiology 2006.
397. Guisasola MC, Dulin E, Desco MM, Sánchez MJ, García-Barreno P. Epidemiological study of polymorphisms of *hsp72* promoter gene and its translation product. *Cell Stress and Chaperones* 2007;12 (2).
398. Guisasola M, Dulin E, Desco M, Sánchez M y García-Barreno P. Epidemiología de los factores de riesgo vascular clásicos, homocisteinemia y anticuerpos a proteínas de choque térmico. XXVIII

- Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI).21-24 noviembre de 2007. Rev Clin Esp 2007.
- 399.** Dulin E, Desco MM, Guisasola MC. Cardiovascular disease and Heat Shock Proteins (Hsps). 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Francisco, december 13-17, 2008.
- 400.** Guisasola MC, Dulin E, Sánchez MJ, García-Barreno P. Heat shock proteins (Hsps), biomarkers of toxicity of xenobiotic agents?. 25th Congress of the European Society of Comparative Biochemistry and Physiology. Ravenna, Italy, september 7-11, 2008. Comp Biochemistry and Physiology 2008;151A (1): S37-S43.